

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.- Prof. Dr. med. vet. E. Wolf

Angefertigt im Klinikum der Universität München
Medizinische Klinik und Poliklinik I – Großhadern
(Dr. med. C. Brenner und Prof. Dr. med. W.-M. Franz)

**Untersuchungen zur
Progenitorzell-vermittelten endothelialen Regeneration
im Carotid injury-Modell der Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Sarah Patricia Kühlenthal

aus Karlsruhe

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	8
II.	LITERATURÜBERSICHT	10
2.1.	Die koronare Herzerkrankung (KHK), die periphere (pAVK) und cerebrale arterielle Verschlusskrankheit (cAVK)	10
2.2.	Pathophysiologie der Atherosklerose	11
2.3.	Therapiemöglichkeiten der KHK	13
2.3.1.	Kontrolle der Risikofaktoren und medikamentöse Therapie	14
2.3.2.	Interventionelle Revaskularisation: PTCA und Stent	15
2.3.1.	Chirurgische Revaskularisation: Die Bypass-Operation	17
2.4.	Therapiemöglichkeiten der pAVK und der cAVK	18
2.5.	Restenose	19
2.6.	Atherosklerose im Tiermodell	20
2.7.	Endotheliale Progenitorzellen	21
2.7.1.	Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen	21
2.7.1.1.	Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen anhand spezifischer Oberflächenantigene	22
2.7.1.2.	Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen anhand ihrer Eigenschaften in Kultur	23
2.7.2.	Unterschiede der endothelialen Progenitorzellen	23
2.7.3.	Ursprung der endothelialen Progenitorzellen	25
2.7.4.	Therapieansätze mit EPC- Einsatzmöglichkeiten, Anwendung, Limitation	26
2.7.4.1.	Transplantation von endothelialen Progenitorzellen	27
2.7.4.2.	Endogene Mobilisation von EPCs	30
2.8.	Rolle des SDF-1/CXCR4-Signalwegs für die Migration von Stammzellen	33
2.9.	Beteiligung des SDF-1/CXCR4-Signalweges bei der Reendothelialisierung und Restenose	38
III.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	40
IV.	VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN	41

4.1.	Versuchstiere	41
4.1.1.	Gesetzliche Rahmenbedingungen	41
4.1.2.	Eingesetzte Versuchstiere	41
4.1.3.	Haltungsbedingungen	41
4.2.	Material	42
4.2.1.	Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel, Substanzen	42
4.2.2.	Pharmaka	42
4.2.3.	Operationszubehör für das elektrische Carotid injury-Modell	43
4.2.4.	Zubehör für das Reendothelialisierungs-Assay	44
4.2.5.	Laborgeräte und sonstige Materialien	44
4.2.6.	Zubehör für die FACS-Analyse	45
4.2.7.	Zubehör für die quantitative Real-time RT-PCR	45
4.2.8.	Zubehör für die Massenspektrometrie	46
4.2.9.	Hard- und Software	46
4.3.	Methoden	46
4.3.1.	Carotid injury-Modell	46
4.3.1.1.	Versuchsdurchführung	46
4.3.1.2.	Behandlung mit AMD 3100, G-CSF Sitagliptin und Vildagliptin	48
4.3.1.3.	Carotis-Entnahme und Fixierung bzw. Vorbereitung für weitere Analysen	49
4.3.2.	Quantitative Real-time RT-PCR	49
4.3.2.1.	Prinzip der quantitativen Real-time RT-PCR	49
4.3.2.2.	Versuchsaufbau	51
4.3.2.3.	Probengewinnung	51
4.3.2.4.	RNA-Isolierung mit Trizol	52
4.3.2.5.	DNase-Verdau	52
4.3.2.6.	cDNA-Synthese	53
4.3.2.7.	Quantitative Real-time RT-PCR mit IQ SYBR Green Supermix (BioRAD)	53
4.3.2.8.	Auswertung mittels delta-delta- C_T -Methode	55
4.3.3.	FACS-Analyse	56
4.3.3.1.	Prinzip der FACS-Analyse	56
4.3.3.2.	Versuchsaufbau: FACS-Analyse	56
4.3.3.2.1.	Gewinnung, Aufreinigung und Färbung der Stammzellen mit DiI aus dem Knochenmark von Spendermäusen	57

4.3.3.2.2.	Carotid injury und Transplantation der DiI-gefärbten Stammzellen	58
4.3.3.2.3.	Probengewinnung, Weiterverarbeitung, Färbung mit dem CXCR4-Antikörper und FACS-Analyse	59
4.3.4.	Reendothelialisierungs-Assay	60
4.3.4.1.	Versuchsaufbau: Reendothelialisierungs-Assay	60
4.3.5.	Durchführung des Reendothelialisierungs-Assays.....	61
4.3.6.	Massenspektrometrie.....	63
4.3.6.1.	Versuchsaufbau	63
4.3.6.2.	Probengewinnung und Weiterverarbeitung.....	64
4.3.7.	Statistische Auswertung	65
V.	ERGEBNISSE	66
5.1.	Expression von SDF-1 alpha nach Carotid injury.....	66
5.2.	Homing CXCR4 ⁺ -Stammzellen im Carotid-injury-Modell	67
5.3.	Inhibition der DPP IV unter oraler Gliptin-Therapie im Carotid-injury-Modell der Maus – Nachweis mittels Massenspektrometrie	69
5.3.1.	DPP IV-Aktivität im Blut.....	70
5.3.2.	DPP IV-Aktivität im Carotisgewebe.....	70
5.4.	Reendothelialisierung.....	72
5.4.1.	Etablierung des Reendothelialisierungs-Assays im Labor.....	72
5.4.2.	Einfluss von G-CSF und Sitagliptin auf die Reendothelialisierung eines Gefäßschadens.....	73
5.4.3.	Einfluss von Vildagliptin auf die Reendothelialisierung eines Gefäßschadens.....	76
5.4.4.	Einfluss der SDF-1 α /CXCR4-Achse auf die Reendothelialisierung eines Gefäßschadens.....	78
VI.	DISKUSSION	81
6.1.	Bedeutung der SDF-1alpha/CXCR4-Achse am verletzten Endothel.....	82
6.2.	Gliptine als neuer therapeutischer Ansatz zur Stabilisierung der SDF-1Alpha/CXCR4-Achse bei Endothelschäden.....	83
6.3.	Auswirkung von Gliptinen und G-CSF auf die Reendothelialisierung.....	86
6.4.	Vorteile des elektrischen Carotid injury-Modells	91
6.5.	Komplikationen des elektrischen Carotid-Injury-Modells.....	92
6.6.	Limitationen der Arbeit	93
6.7.	Duale Stammzelltherapie zur Behandlung von Endothelschäden – ein	

	Ausblick	94
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	96
VIII.	SUMMARY.....	98
IX.	ANHANG	99
X.	LITERATURVERZEICHNIS	101
XI.	DANKSAGUNG	117

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen trotz intensiver Forschung nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Allein in Deutschland sind 342 233 Sterbefälle (40,2 % der Sterbefälle insgesamt) im Jahr 2011 die Folge von Herzinfarkten, Schlaganfällen und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit [1].

Zu Grunde liegt die Atherosklerose, eine multifaktoriell bedingte, chronische Veränderung der Gefäßwand, die durch intra- und extrazelluläre Lipidablagerungen sowie inflammatorische Vorgänge charakterisiert ist und im fortgeschrittenen Stadium zu Gefäßverengungen und -verschlüssen führt [2]. Als Hauptrisikofaktoren gelten Nikotinabusus, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und die Hypercholesterinämie. Neben Risikofaktorkontrolle und medikamentöser Therapie sind heute die perkutane transluminale Angioplastie und die Bypass-Operation etablierte Behandlungsoptionen [3]. Obgleich in den letzten Jahrzehnten ein rasanter wissenschaftlicher und klinischer Fortschritt auf dem Gebiet der Revaskularisation zu verzeichnen ist, gilt es immer noch als große therapeutische Herausforderung, eine endogene Regeneration der kalzifizierten atherosklerotisch veränderten Gefäßwand zu erzielen. Häufig nämlich kommt es nach Gefäßdilatation und Stentimplantation zu Restenosen aufgrund einer lokalen neointimalen Hyperplasie, die bis hin zum erneuten Verschluss der betroffenen Arterie führen kann.

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, um die Reendothelialisierung in geschädigten Gefäßen zu fördern und so der Neointima-Bildung entgegen zu wirken, liegt in der Nutzung endothelialer Progenitorzellen (EPCs) [4-7]. EPCs sind zirkulierende, mononukleäre Zellen, die aus dem Knochenmark und anderen Organen mobilisiert werden können [8-12] und durch chemotaktische Wechselwirkungen in Areale endothelialer Schädigung einwandern. Dort können sie dann über verschiedene Mechanismen wesentlich zur Reendothelialisierung beitragen. Hierbei scheinen die parakrinen Effekte der EPCs eine wichtigere Rolle zu spielen als ihre mögliche Differenzierung in reife Endothelzellen und nachfolgende Integration in das Endothel [13, 14].

Als einer der tragenden Mechanismen des Progenitorzellhomings ist der SDF-

1 α /CXCR4-Signalweg beschrieben. In Folge eines Endothelschadens wird von den angrenzenden Endothelzellen, den darunterliegenden aktivierten glatten Muskelzellen und den anlagernden Blutplättchen das Zytokin SDF-1 α sezerniert [15-18]. SDF-1 α wiederum bindet an den auf der Zelloberfläche von zirkulierenden EPCs exprimierten CXCR4-Rezeptor. Eben diese Interaktion ermöglicht den EPCs eine zielgerichtete chemotaktische Migration zu der deendothelialisierten Gefäßläsion [19-22]. Dieser Mechanismus wird über die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4/CD26) reguliert, die ubiquitär im Blut und als membranständiges Enzym auf zahlreichen Zelloberflächen vorhanden ist. Durch N-terminale Abspaltung eines Dipeptids (X-Pro) ist die DPP IV in der Lage SDF-1 α zu inaktivieren [23-25].

In zahlreichen Arbeiten konnte mittlerweile gezeigt werden, dass EPCs positive Effekte auf das Remodeling einer Gefäßläsion haben, die während einer perkutanen Intervention verursacht wird. Eine raschere Endothelialisierung, die von EPCs vermittelt wird, minimiert das Risiko einer neointimalen Hyperplasie und einer nachfolgenden Restenose [7, 20, 26-28].

Folglich stellt die medikamentöse Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse einen attraktiven Therapieansatz dar. Dieses Konzept wurde bereits beim Myokardinfarkt erfolgreich angewandt. Bei der sogenannten dualen Stammzelltherapie konnte durch die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark durch G-CSF und gleichzeitige Inhibition der DPP IV ein vermehrtes Homing von CXCR4⁺ Stammzellen am ischämischen Gewebe beobachtet werden. In der Folge zeigte sich ein positives Remodeling des Infarktareals mit Verbesserung der Pumpfunktion und des Überlebens [23, 29].

Ziel dieser Arbeit war es, die Relevanz der SDF-1 α /CXCR4-Achse bei der EPC-vermittelten Reendothelialisierung von Gefäßschädigungen zu untersuchen. Ferner sollte überprüft werden, ob eine medikamentöse Inhibition der DPP IV analog dem Myokardinfarktmodell einen protektiven Effekt auf die Endothelheilung hat.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1. DIE KORONARE HERZERKRANKUNG (KHK), DIE PERIPHERE (PAVK) UND CEREBRALE ARTERIELLE VERSCHLUSS-KRANKHEIT (CAVK)

Die koronare Herzerkrankung ist definiert als eine klinische Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien. Durch fortschreitende Lumeneinengung und akute Gefäßverschlüsse entsteht eine Myokardischämie, die sich klinisch als Angina pectoris, Myokardinfarkt mit nachfolgender Linksherzinsuffizienz und/oder Herzrhythmusstörungen äußern kann.

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit dagegen charakterisieren stenosierende und okkludierende Veränderungen in den Extremitätenarterien und weitaus seltener in der Aorta [30]. Klinisch wird bei der chronischen pAVK das Stadium der Claudicatio intermittens mit belastungsabhängigen Schmerzen (Stadium II nach Fontaine) und das Spätstadium der kritischen Ischämie, das Ruheschmerzen (Stadium III) und Ulzera (Stadium IV) kennzeichnen, unterschieden. Insbesondere im Stadium der kritischen Ischämie liegt bei Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten von Myokardinfarkt und Schlaganfall vor. Ebenso besteht die Gefahr einer Majoramputation der betroffenen Gliedmaße [31, 32].

Die Carotisstenose ist in den Krankheitskomplex der arteriellen Verschlusskrankheiten (cAVK) der Hirnarterien einzuordnen, wobei symptomatische Veränderungen vor allem im Bereich der Carotis-Bifurkation und der proximalen *A. carotis interna* auftreten [30], da es hier durch veränderte Blutflusseigenschaften (Scherkräfte durch turbulenten Blutfluss) zu einer erhöhten Beanspruchung der Gefäßwände kommt. 20-25% der Schlaganfälle sind die Folge von Carotisstenosen [33]. Sowohl die pAVK als auch die cAVK lassen sich ätiologisch meist auf eine zugrundeliegende Atherosklerose zurückführen [30].

2.2. PATHOPHYSIOLOGIE DER ATHEROSKLEROSE

Atherosklerose ist eine langsam fortschreitende, chronische Erkrankung, die durch Entstehung lipidreicher Läsionen in der Wand arterieller Blutgefäße charakterisiert ist. Diese sogenannten atherosklerotischen Plaques bestehen vornehmlich aus einem Nekroseherd, kalzifizierten Bereichen, einer Ansammlung von modifizierten Lipiden, migrierten glatten Muskelzellen (smooth muscle cells/SMCs), Schaumzellen, Endothelzellen und Leukozyten [34].

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Atherosklerose zu den Lipidspeicherkrankheiten gehört [35]. Seit einiger Zeit ist aber bekannt, dass neben der Einlagerung von Lipiden eine chronische Entzündung für die Pathogenese der Atherosklerose entscheidend ist [36].

Gemäß des „response-to-injury“-Modells steht am Anfang der Erkrankung eine endotheliale Dysfunktion, die durch Störungen im Blutfluss (Scherkräfte) oder freie Radikale verursacht wird. Die Bildung freier Radikale wird begünstigt durch Rauchen, Diabetes mellitus, hohe Homocystein-Konzentrationen im Plasma und darüber hinaus durch Infektionen mit Mikroorganismen [2].

Durch die endotheliale Dysfunktion erfolgt der Verlust der natürlichen Barrierefunktion des Endothels, das infolgedessen eine erhöhte Permeabilität gegenüber cholesterolreichen Plasmaproteinen (low density lipoprotein/LDL) aufweist. Die eingedrungenen Plasmaproteine akkumulieren im subendothelialen Kompartiment und werden vor allem durch Oxidation modifiziert. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion des betroffenen Gefäßwandabschnitts, was eine Rekrutierung von Makrophagen bedingt. Die Makrophagen beginnen mit einer unkontrollierten Phagozytose des modifizierten LDLs und die sogenannten Schaumzellen entstehen. Fettstreifen (fatty streaks) treten als erstes morphologisches Merkmal der Atherosklerose in Erscheinung, die sich aus einer Ansammlung von subendothelialen Schaumzellen zusammensetzen [2].

Die Schaumzellen beginnen nun ihrerseits proinflammatorische Faktoren zu sezernieren (u.a. IL-1 β und TNF- α). Diese Faktoren aktivieren glatte Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells/SMCs) und Fibroblasten, die an der Entzündungsreaktion teilnehmen. Die SMCs sind die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix und sind dadurch maßgeblich für das Wachstum der Läsion verantwortlich [2]. Zusätzlich regen die proinflammatorischen Faktoren ansässige

Endothelzellen an, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren [37]. Dies führt neben der Adhäsion von weiteren Entzündungszellen zu einer Aktivierung der Blutplättchen, die nun als weiterer entscheidender Faktor am atherosklerotischen Geschehen teilhaben. Die aktivierten Plättchen sezernieren Zytokine, Wachstumsfaktoren und Thrombin, was die Progression der Atherosklerose durch Migration und Proliferation von SMCs und Entzündungszellen weiter unterhält [38].

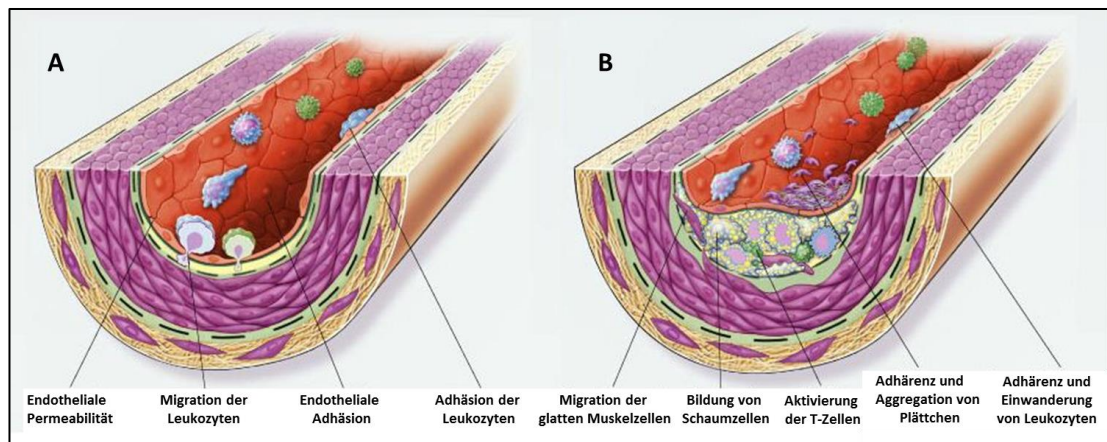


Abbildung 1: Am Anfang der Atherosklerose steht die endotheliale Dysfunktion, die zu einer erhöhten Permeabilität für LDL und Leukozyten führt (A); fatty streaks aus Schaumzellen entstehen, Plättchen und SMCs nehmen nun an der Entzündungsreaktion teil und tragen zu dem progressiven Charakter der Atherosklerose bei (B) (aus [2]).

Der fortdauernde Kreislauf von Akkumulation mononukleärer Zellen, Migration und Proliferation von SMCs, Aktivierung von Plättchen und Bildung von fibrotischem Gewebe führt zu Strukturveränderungen der Plaques, darunter Kalzifizierung der Matrix und schließlich über Jahre zur Ausbildung einer komplexen atherosklerotischen Läsion. Schließlich wird der Herd aus modifizierten Lipiden und nekrotischem Gewebe aus zugrunde gegangenen Schaumzellen von einer kollagenreichen fibrösen Kappe umschlossen, um die Läsion vom Lumen abzugrenzen, was folglich als eine Art körpereigener Heilungsprozess verstanden werden kann [2]. Bei stetigem Plaquewachstum kann es zu einer erheblichen Lumeneinengung des betroffenen Gefäßabschnitts bis hin zu einer vollständigen Okklusion kommen, was sich bei Herzkranzgefäßen klinisch als Angina pectoris- Beschwerden äußern kann [39].

Am Ende ist diese Entwicklung aber auch abhängig vom Plaqueaufbau. Neben

einer Okklusion des betroffenen Gefäßabschnitts ist auch eine Ruptur oder Ulzeration der Kappe möglich. Atherosklerotische Läsionen, bei denen das Risiko dazu besteht, werden als vulnerable Plaques bezeichnet. An diesem Prozess ist maßgeblich die Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) beteiligt, die von den eingewanderten Makrophagen sezerniert wird [39]. Die entstandene Läsion bildet die Grundlage für Thromben oder Embolien und kann schließlich zum akuten Myokardinfarkt, Schlaganfall oder zu Durchblutungsstörungen der Extremitäten führen [40].

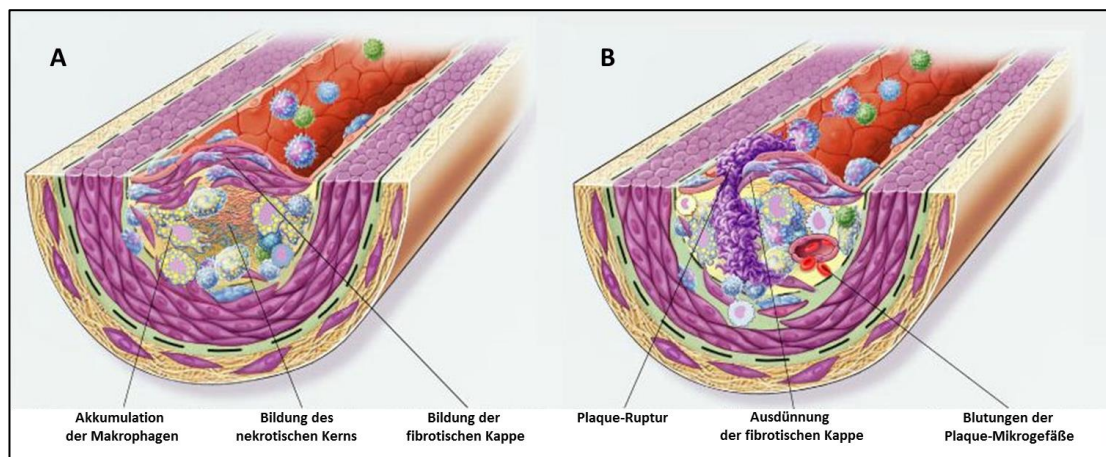


Abbildung 2: Über Jahre entwickelt sich eine komplizierte atherosklerotische Läsion mit einem nekrotischen Kern und einer aufgelagerten kollagenreichen, fibrotischen Kappe; die Läsion kann sich schließlich okkludierend auf ein Gefäß auswirken (A) oder die Kappe ulzeriert bzw. rupturiert und bietet die Grundlage für Thromben (B) (aus [2]).

2.3. THERAPIEMÖGLICHKEITEN DER KHK

In den nationalen Versorgungsleitlinien sind die Therapieziele einer chronischen KHK klar definiert, dementsprechend ist die kardiovaskuläre Morbidität und die krankheitsbedingte Sterblichkeit mittels angepasster Behandlung zu reduzieren. Weiter muss die Lebensqualität der Patienten gesteigert werden, indem Angina pectoris-Beschwerden verhindert werden, die Belastungsfähigkeit erhalten und KHK-assoziierten psychischen Erkrankungen entgegengewirkt wird [41]. Zunächst gilt es bei den betroffenen Patienten die entsprechenden Risikofaktoren zu minimieren und die medikamentösen Therapiemöglichkeiten auszuschöpfen

[42]. Die Indikation für eine Revaskularisation ist dann gegeben, wenn der Anteil des ischämischen Myokards $> 10\%$ beträgt [43].

2.3.1. Kontrolle der Risikofaktoren und medikamentöse Therapie

Die Weltgesundheitsorganisation unterteilte die Risikofaktoren für eine KHK in Faktoren erster und zweiter Ordnung:

Risikofaktoren erster Ordnung	Risikofaktoren zweiter Ordnung
Arterielle Hypertonie	Adipositas
Diabetes mellitus	Hyperurikämie
Hypercholesterinämie	Bewegungsmangel
Nikotinabusus	Stress

Tabelle 1: Risikofaktoren für die KHK

Weiter gibt es Risikofaktoren, die nicht beeinflussbar sind, wie Alter, Geschlecht und genetische Prädisposition [30, 44].

An erster Stelle bei der Behandlung von KHK-Patienten steht eine Veränderung des Lebensstils, wie die Nikotinentwöhnung, Gewichtsabnahme, die Ernährung auf eine fettarme, ballastreiche Diät umzustellen, kontrolliertes körperliches Training [45] und Stressvermeidung. Zudem muss eine optimale Einstellung zuckerkranker Patienten gewährleistet sein und eine medikamentöse Senkung der arteriellen Hypertonie sowie der Cholesterolverwerte bei den betroffenen Patienten erfolgen [3, 30].

Darüber hinaus ist das Therapieziel bei klinisch manifesten Formen eine Progression der atherosklerotischen Veränderungen zu vermeiden bzw. eine Regression zu erzielen.

Ein effektiver Ansatz ist das Verabreichen von Thrombozytenaggregationshemmern, als Vertreter seien Acetylsalicylsäure und Clopidogrel genannt [46]. Diese werden auch nach Stent-Implantationen verabreicht, um eine Stentthrombose zu vermeiden [30, 47].

Auch Statine werden bei der Atherosklerose eingesetzt, da sie neben Senkung des Cholesterolspiegels antiinflammatorische Wirkung haben [48] und dazuhin die atherosklerotischen Plaques vor Ulzeration und Ruptur bewahren [49, 50].

Weiter konnten vielversprechende Ergebnisse mit DPP IV-Inhibitoren im diabetischen Tiermodell erzielt werden. Entsprechend konnte durch Langzeitgabe des Antidiabetikums Alogliptin eine deutliche Reduzierung von atherosklerotischen Veränderungen bei *Ldlr*^{-/-}-Mäusen erreicht werden. Dies wird auf antiinflammatorische Effekte der DPP IV-Inhibitoren zurückgeführt, die sowohl Chemotaxis als auch Aktivierung der Monozyten zu hemmen scheinen [51].

Die Angina pectoris tritt in der Regel bei Koronarstenosen $\geq 75\%$ auf und stellt das klinische Leitsymptom einer Koronarinsuffizienz dar. Die retrosternalen Schmerzzustände, die vor allem während physischer oder psychischer Belastung auftreten und durch eine relative Myokardischämie verursacht werden, können in Hals, Unterkiefer, Schultern und Arme ausstrahlen [30].

Ziel der medikamentösen Therapie der Angina pectoris ist es, die Anfallsfrequenz zu vermindern und im optimalen Fall eine Beschwerdefreiheit des Patienten zu erreichen. Die Wirkung aller pharmakologischen Substanzen zielt auf einen verminderten Sauerstoffverbrauch ab. Hierzu werden vor allem β -Rezeptorblocker genutzt [30].

2.3.2. Interventionelle Revaskularisation: PTCA und Stent

Seit Andreas Gruentzig 1977 die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) zum ersten Mal erfolgreich durchführte, hat dies die Behandlung von Patienten mit KHK revolutioniert. So erspart ihnen dieses minimal-invasive Verfahren die Risiken und Nebenwirkungen eines chirurgischen Eingriffs. In den USA ist die Anzahl der durchgeführten perkutanen Interventionen mittlerweile etwa doppelt so hoch wie die der Bypass-Operationen, in Deutschland sogar noch um einiges höher [52, 53].

Bhargava *et al.* teilen die Entwicklung dieses Eingriffs in 3 Phasen ein:

- Phase 1 (1977-1978): einfache Ballonangioplastie
- Phase 2 (1988-1992): weiterentwickelte Ballonangioplastie
- Phase 3 (1993-2002): Stent

Bei der PTA (perkutane translumina Angioplastie) wird ein Ballonkatheter mit dem passenden Durchmesser auf einem Führungsdraht bis in die Gefäßstenose vorgeschoben und anschließend für Sekunden bis einige Minuten expandiert.

Anschließend wird der Ballonkatheter zurückgezogen. Falls nach anschließender Angiographie das Ergebnis nicht zufriedenstellend sein sollte, kann über den verbliebenen Führungsdraht der Vorgang mit einem Ballonkatheter größeren Kalibers problemlos wiederholt werden [54]. Der Hauptmechanismus der Ballonangioplastie besteht in der Verdrängung und der Kompression des Plaquematerials [55].

Seit Sigwart 1987 die Verwendung von Stents in der Kardiologie etablierte [56] ist ihre Bedeutung für die Medizin rasant gestiegen. So kommen Stents heute bei 70-80% aller perkutanen transluminalen Koronarangioplastien zum Einsatz. Diese Entwicklung hat gute Gründe, da der Einsatz von Stents der alleinigen PTCA unter mehreren Aspekten deutlich überlegen ist [57-60]. Der Stent wird nach erfolgreicher Ballondilatation über einen Katheter durch Aufdehnung oder Selbstexpansion in das Gefäß implantiert. Die fortdauernde Dehnung des betroffenen Gefäßabschnitts wirkt akuten oder chronischen Rückstellkräften (Recoil) entgegen. Zudem wird durch Abstützen der Gefäßwand die Hämodynamik begünstigt, was dem pathologischen Remodeling entgegenwirkt. In der Folge treten Restenosen bei Patienten mit Stent deutlich seltener auf (sog. in-stent Restenosen bei 10-30%) als bei Patienten mit alleiniger Ballonangioplastie (20-50%) [53, 54, 57, 58, 61].

Nichtsdestotrotz wurde und werden Stents weiter optimiert, um das Risiko einer Restenose so gering wie möglich zu halten. Seit 2002 sind in Deutschland medikamentös beschichtete Stents (drug-eluting stents) auf dem Markt, die durch Abgabe antiproliferativer Substanzen sehr gute Erfolge bezüglich der Vermeidung einer Restenose zeigen (Restenoserate von 8-15%) [62-65]. Neben dem erwünschten antiproliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen (SMC) wirken sich diese Stents aber ebenso hemmend auf die Proliferation von Endothelzellen aus. Dadurch ist mit einer verzögerten Reendothelialisierung und infolgedessen mit einer gesteigerten Stent-Thrombose-Neigung zu rechnen [42].

Ein anderer vielversprechender Ansatz in der Stent-Technologie liegt in der Unterstützung einer raschen Reendothelialisierung des Endotheldefekts, der aufgrund des Stentings entstanden ist. Eine intakte Endothelzellschicht wirkt sowohl einer Neointimabildung als auch Stent-Thrombosen entgegen. Eine mögliche Herangehensweise ist die Beschichtung von Stents mit Agenzien (cRCG, CD34-Antikörper, VE-Cadherin), die das Homing endothelialer

Progenitorzellen fördern können [27, 66] oder die Implantation von Stents, die vorab mit EPCs beschichtet wurden [28]. In ersten klinischen Studien konnten sehr positive Ergebnisse sowohl mit einer CD34-Ak-Beschichtung [67, 68] als auch mit einer EPC-Beschichtung erzielt werden [69].

Neben „drug-eluting“ Stents und Stents, die auf eine beschleunigte Reendothelialisierung abzielen, wird die Entwicklung von resorbierbaren, beschichteten Stents teilweise schon als neuer Meilenstein in der perkutanen Intervention angesehen [70, 71]. Die Idee dahinter ist, dass Stents solange im Gefäß verbleiben wie ihre mechanische Unterstützung von Nutzen ist und sich hinterher abbauen, um eine natürliche Heilung des Gefäßes ohne permanenten Fremdkörper-Stimulus zu ermöglichen. Vor allem das Risiko einer Stent-Thrombose und der Neointima-Bildung durch Scherkräfte soll durch resorbierbare Stents deutlich minimiert werden. In der ABSORB-Studie konnten bereits Unbedenklichkeit und Wirksamkeit gezeigt werden. Weitere, vor allem vergleichende Studien mit nicht-resorbierbaren, beschichteten Stents müssen trotz aller Euphorie nun erst einmal abgewartet werden [72].

2.3.1. Chirurgische Revaskularisation: Die Bypass-Operation

Im Jahr 1964 wurde die erste Bypass Operation von Garrett, Dennis und DeBakey durchgeführt. Ziel der Operation ist eine Überbrückung des stenosierten Gefäßes mit Hilfe eines umleitenden Gefäßtransplantats [73]. Dies erfolgt in den meisten Fällen in einer Operation am offenen, stillgelegten Herzen mit oder ohne Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine [30].

Eine aortokoronare Bypass-OP ist dann einer perkutanen Intervention vorzuziehen, wenn eine koronare 3-Gefäßerkrankung oder eine Hauptstammstenose vorliegt. Außerdem wenn die Stenose an für die PTCA ungünstigen Stellen lokalisiert ist, beispielsweise an komplexen Aufzweigungen oder starker Torquierung eines Gefäßes [3]. Auch bei Diabetikern und Patienten mit Niereninsuffizienz kann die Bypass-Operation aufgrund der meist hochgradig diffusen atherosklerotischen Veränderungen bei dieser Patientengruppe von Vorteil sein [74, 75].

Als autologes Bypassmaterial werden arterielle oder venöse Grafts verwendet, so gelten die linke und die rechte *A. thoracica (mammaria) interna* als Goldstandard, da sie nach 10 Jahren mit einer Offenheitsrate von 90% überzeugen. Reichen

diese Gefäße nicht aus, werden für gewöhnlich additiv die *V. saphena magna* (Offenheitsrate von 50% nach 10 Jahren) und die *A. radialis* (Offenheitsrate von 80% nach 10 Jahren) verwendet [30].

2.4. THERAPIEMÖGLICHKEITEN DER PAVK UND DER CAVK

Sowohl der pAVK und als auch der cAVK liegt in der Regel ein atherosklerotisches Krankheitsgeschehen zugrunde. So gilt es analog zu den KHK-Patienten zunächst die Risikofaktoren der Betroffenen zu minimieren – gegebenenfalls auch medikamentös, welche eine Progression der Atherosklerose begünstigen. Darüber hinaus wird insbesondere bei der symptomatischen pAVK ein besonderes Augenmerk auf die Verbesserung des peripheren Blutflusses durch Kollateralenbildung gelegt. Hierbei nimmt neben der medikamentösen Therapie das strukturierte Gehtraining je nach Stadium eine wichtige Rolle ein [31, 77].

Die Entscheidung für eine arterielle Rekonstruktion bei der pAVK ist in Abhängigkeit der Lokalisation, des Nutzen-Risiko-Verhältnisses, der klinischen Symptomatik und des individuellen Behandlungswunsches des Patienten zu treffen. Dabei wird grundsätzlich der Katheter-basierten Therapie der Vorzug gegeben, wenn mit ihr kurz- und langfristig die gleiche symptomatische Verbesserung erzielt werden kann wie mit einem chirurgischen Eingriff [31]. Eine zusätzliche Stentimplantation nach erfolgreicher PTA wird unter anderem bedingt von Art und Lokalisation der atherosklerotischen Läsionen und nimmt in den letzten Jahren stetig zu. Während die Implantation von Gefäßstents in Gelenknähe aufgrund des erhöhten Risikos von Stentfrakturen eher problematisch zu beurteilen ist, wird es beispielsweise in der *A. iliaca communis* und *externa* generell angeraten. So wird die Restenoserate gegenüber alleiniger Ballonangioplastie (bis zu 60 %) mittels Implantation von Stents im femoropoplitealen Bereich deutlich reduziert [31, 78, 79].

Patienten mit asymptomatischen Verengungen der hirnversorgenden Arterien mit einer Lumeneinengung von über 70 % profitieren bereits von einer Gefäßrekonstruktion mittels Thrombendarteriektomie (TEA) und unter Umständen auch von interventionellen Therapieverfahren (PTA mit Stenting, Carotid artery stenting, CAS) [77] durch Reduktion des Schlaganfallrisikos. Bei der TEA wird die Carotis eröffnet und es werden die atherosklerotischen Plaques

entfernt. Während die TEA immer noch als Goldstandard gilt, erfreut sich das jüngere Verfahren des CAS immer größerer Beliebtheit, was eine Reihe von vergleichenden klinischen Studien zwischen den beiden Methoden angeregt hat [33, 77, 80, 81]. Bislang konnte allerdings noch nicht abschließend geklärt werden, welches Verfahren für welche Rahmenbedingungen das überlegene darstellt, unter anderem da teilweise recht widersprüchliche Studienergebnisse erzielt wurden [33, 80]. Dennoch scheint das CAS eine Alternative zu der TEA darzustellen, vor allem für Patienten mit einem erhöhten Operationsrisiko und für Patienten unter 70 Jahre [33, 81]. Die Angaben zur Restenoserate (erneute Lumeneinengung von $> 50\%$) nach CAS unterliegen je nach Studie gewissen Schwankungen. Diese scheint aber im Bereich von 8-10 % zu liegen [82].

2.5. RESTENOSE

Die Restenose ist die erneute Lumeneinengung eines Gefäßes um 50% oder mehr nach einer erfolgreich durchgeführten interventionellen Revaskularisation [53, 83]. Sie kommt durch überschießende Reparationsmechanismen zustande und tritt meist innerhalb der ersten Monate auf [84]. Drei Faktoren sind an der Ausbildung einer Restenose beteiligt: Die Rückstellkräfte des Gefäßes (Recoil), das nachfolgende Remodeling und die Neointimabildung [53, 85].

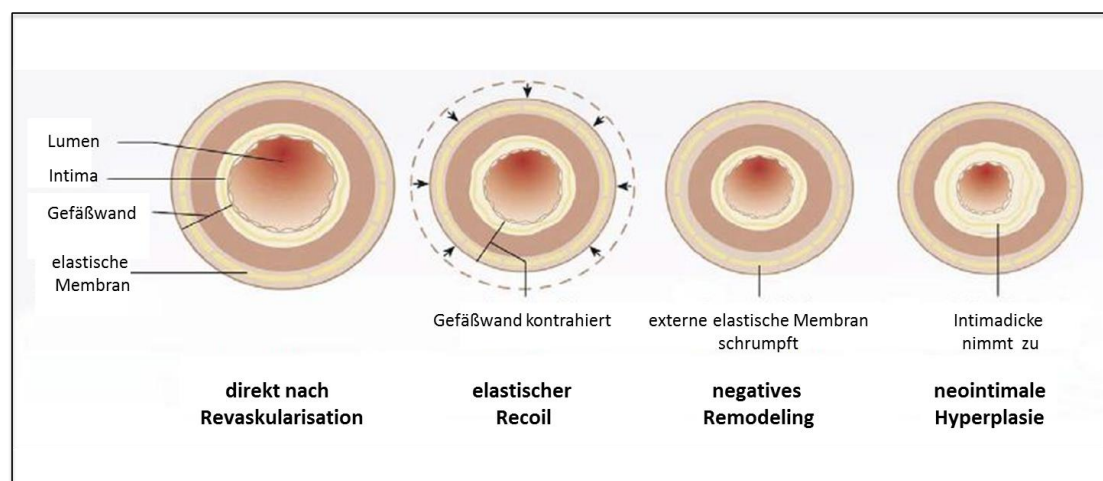


Abbildung 3: Die drei Ursachen einer Restenose nach erfolgreicher interventionellen Revaskularisation: Bei der reinen Ballonangioplastie spielen vor allem das Recoil und das negative Remodeling eine Rolle, während die zusätzliche Implantation von Stents die intimale Hyperplasie begünstigt (modifiziert nach [85]).

Inwieweit jeder dieser Faktoren teilhat, ist abhängig von der Art des Eingriffs. So spielen bei der Ballonangioplastie vor allem das Recoil und das negative Remodeling eine Rolle, wohingegen bei der Implantation von Stents die Neointimabildung die entscheidende Problematik darstellt [53]. Ähnlich der Atherosklerose geht dieser pathologischen Entwicklung ein Endotheldefekt voraus [86], der durch den Eingriff verursacht wurde und nachfolgend zu einer Migration von Leukozyten und Anlagerung von Blutplättchen führt. Sezernierte Wachstumsfaktoren und Zytokine sind schließlich die wesentlichen Stimuli für die Proliferation der vaskulären, glatten Muskelzellen (smooth muscle cells/SMCs) und der extrazellulären Matrix [53, 84]. So gilt die möglichst rasche Wiederherstellung einer intakten Endothelzellschicht als ein vielversprechender Therapieansatz zur Vermeidung von Restenosen [87].

2.6. ATHEROSKLEROSE IM TIERMODELL

Zur wissenschaftlichen Untersuchung der Atherosklerose existieren nur wenige Tiermodelle, da sie ein sehr komplexes Krankheitsgeschehen darstellt, das bis auf wenige Ausnahmen natürlicherweise nur beim Menschen auftritt. Atherosklerotische Veränderungen sind noch beim Schwein und bei bestimmten Affenarten beschrieben, wobei die Letzteren aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen in den meisten Fällen als Versuchstiere ausscheiden. Dies führte dazu, dass neben gezielter Provokationsfütterung der Versuchstiere mit extrem cholesterolreicher Nahrung genetisch veränderte Tiermodelle entwickelt werden mussten, um der Atherosklerose im Menschen vergleichbare Versuchsbedingungen zur Erforschung des Krankheitsbildes zu schaffen [88].

Schweine stellen ein sehr überzeugendes Modell dar, da sie, wie eingangs erwähnt, gemeinsam mit Affen die einzigen Tiere sind, die unter Normaldiät atherosklerotische Läsionen entwickeln können. Bei high-fat-Fütterung weisen sie sogar Plasmacholesterolverwerte und atherosklerotische Veränderungen auf, die denen der Menschen entsprechen. Darüber hinaus gibt es auch mutante Schweine, wie solche mit einer Lipoprotein-Mutation [89]. Dennoch ist der Einsatz von Schweinen als Versuchstier häufig durch die aufwendige und kostenintensive Haltung limitiert [88].

Mäuse werden hingegen aufgrund ihrer unkomplizierten Haltung und ihres schnellen Generationswechsels in vielen Laboren genutzt. In der Atherosklerose-Forschung muss beachtet werden, dass sie sich in ihrem Lipidstoffwechsel stark von dem des Menschen unterscheiden und nicht ohne weiteres Atherosklerose entwickeln [88]. Dennoch ist es bei Wildtyp-Mäusen möglich mit einer hoch angereicherten Cholesterol-Diät über einen langen Zeitraum atherosklerotische Veränderungen zu provozieren [90]. Für die Forschung musste aber eine zeitsparendere und zuverlässigere Methode gefunden werden. So begann die gezielte Züchtung und genetische Manipulation. Eines der gängigsten Atherosklerose-Modelle heute ist die Verwendung von *ApoE*^{-/-}-Mäusen [91-93], die bereits unter normaler Fütterung erkranken. Das Apolipoprotein E ist ein integraler Bestandteil von Chylomikronen und ist essentiell für die zelluläre Aufnahme von LDL am LDL-Rezeptor vor allem in der Leber. Ein weiteres Mausmodell sind *Ldlr*^{-/-}-Mäuse, die aufgrund des Rezeptordefekts eine Hypercholesterinämie aufweisen, was schließlich ebenfalls zur Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen führt [94].

Als ein weiteres Modell mit einem Defekt am LDL-Rezeptor-Gen findet das Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen [95] insbesondere bei der Erforschung der familiären Hypercholesterolämie Verwendung. Genetisch unveränderte Kaninchen entwickeln nur dann atherosklerotische Läsionen, wenn sie eine cholesterol- oder fettreiche Diät erhalten. Die Veränderungen bei den Kaninchen zeichnen sich vor allem durch Bildung von Schaumzellen aus [96], die sich dann deutlich fettreicher als beim Menschen zeigen [88, 97].

Hunde und Ratten sind äußerst resistent gegenüber der Ausbildung von Atherosklerose und kommen daher als Tiermodell eher nicht in Frage. Dennoch wurde in der Vergangenheit versucht, einige Rattenmodelle zu etablieren, deren Veränderungen der humanen Atherosklerose zumindest ähneln [88, 98, 99].

2.7. ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN

2.7.1. Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen

Die Fähigkeit von mesodermalen Zellen in Angioblasten und nachfolgend in Endothelzellen zu differenzieren schien nach früherer Lehrmeinung allein der

embryonalen Entwicklung vorbehalten zu sein [100]. Diese These gilt seit 1997 als überholt, nachdem es Asahara und seiner Arbeitsgruppe erstmals gelang, aus zirkulierenden $CD34^{+}$ hämatopoetischen Progenitorzellen einen Zelltyp zu gewinnen, der einem endothelialen Phänotyp entsprach [101]. Diese Zellpopulation wurde unter dem Begriff „endotheliale Progenitorzellen“ (endothelial progenitor cells/EPCs) zusammengefasst und wies Oberflächenantigene sowohl von Progenitor- als auch von Endothelzellen auf. In zahlreichen Ansätzen wurde versucht die heterogene Gruppe der EPCs genauer zu charakterisieren und definieren.

2.7.1.1. Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen anhand spezifischer Oberflächenantigene

Eine der allgemein anerkanntesten Definitionen lautet, dass EPCs mononukleäre Zellen sind, die CD34, CD133 und VEGFR-2 gleichzeitig exprimieren [102, 103]. Diese Definition diente bereits als Grundlage vieler Studiendesigns, in welchen die Rolle von EPCs im Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen untersucht wurde.

Basierend auf den ersten Erkenntnissen wurden die (humanen) endothelialen Progenitorzellen zunächst als Zellen definiert, die sowohl positiv für den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34, als auch für das endotheliale Markerprotein VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor) sind. Da CD34 nicht nur von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, obgleich auch auf anderen Zellen in viel geringerem Maße, ging man später dazu über die Expression von CD133 in die Definition mit aufzunehmen [102, 103]. CD133 ist ein sehr stabiles Antigen mit weitestgehend unbekannter biologischer Funktion, das auf frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, auf ausdifferenzierten Endothelzellen hingegen fehlt.

Häufig ist die Nutzung von Oberflächenantigenen leider ein zweiseitiges Schwert, so führt beispielsweise die Verwendung von CD133, um EPCs von reifen Endothelzellen unterscheiden zu können, gleichzeitig zu einem ungewollten Ausschluss von späten EPCs, die diesen Marker zwar bereits verloren haben, aber noch nicht zu reifen Endothelzellen ausdifferenziert sind [104].

Andere Oberflächenmarker zur Identifizierung von EPCs, wie beispielsweise vWf (von-Willebrand-Faktor) [105], CD31 [106] und CD144 [107] sind zugleich auch

Marker reifer Endothelzellen ebenso wie der Oberflächenrezeptor CXCR4 [108].

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist kein Oberflächenantigen bekannt, mit dessen alleiniger Hilfe man EPCs eindeutig von anderen Zellpopulationen abgrenzen könnte [4].

2.7.1.2. Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen anhand ihrer Eigenschaften in Kultur

Die zweite Definition, die im Allgemeinen benutzt wird, geht auf *in vitro* Arbeiten zurück. Die revolutionäre Veröffentlichung von Asahara [101] beschreibt, dass CD34-reiche mononukleäre Zellpopulationen, die auf Fibronektin kultiviert werden, sich innerhalb von 3 Tagen zu Gebilden formieren, die embryonalen Blutinseln stark ähneln. Zentral befinden sich runde und in der Peripherie spindelförmige Zellen. Diese Zellkolonien werden als colony forming units (CFU) bezeichnet und die spindelförmigen Zellen als EPCs definiert, die unter anderem die Fähigkeit der LDL-Aufnahme zeigen, was ein Merkmal reifer Endothelzellen ist. Seitdem wurde eine Reihe verschiedener Kulturansätze etabliert, um die Differenzierung von humanen mononukleären Zellen (MNCs) in die endotheliale Progenitorzell-Linie zu fördern [109, 110]. Trotz sehr verschiedener Kultivierungsprotokolle der einzelnen Arbeitsgruppen scheint sich ein Konsens über die Jahre entwickelt zu haben: In Folge der *in vitro* Kultivierung erscheinen zwei unterschiedliche Subtypen der EPCs – die frühen spindelförmigen EPCs, die bereits Asahara in seiner Arbeit 1997 beschrieb und die späten endothelial outgrowth cells [104, 111-113].

2.7.2. Unterschiede der endothelialen Progenitorzellen

Basierend auf ihren proliferativen Eigenschaften sind 2 unterschiedliche Phänotypen der EPCs beschrieben [104]. Der erste Typ tritt nach 3-5 Tagen in Kultur in Erscheinung, ist spindelförmig, hat sein Wachstums-Maximum nach etwa 2 Wochen erreicht und zeigt eine Lebensdauer von insgesamt 4 Wochen. Diese Zellen werden von Gulati [111] und Hur [112] als *early EPCs* bezeichnet, von Asahara [101] *attaching cells* genannt und von Rehman als *circulating angiogenic cells (CACs)* identifiziert [114].

Der zweite Typ der EPCs zeigt sich erst viel später, nach etwa 2-3 Wochen Kultivierung und weist ein einschichtiges, kopfsteinpflasterartiges Wachstumsmuster auf, in dem die Einzelzellen nahezu miteinander zu

verschmelzen scheinen. Diese Zellen haben eine Gesamtüberlebensdauer von 12 Wochen und werden von Hur als *späte EPCs* [112] und von Lin und Gulati als *outgrowth ECs (OECs)* [111, 113] bezeichnet.

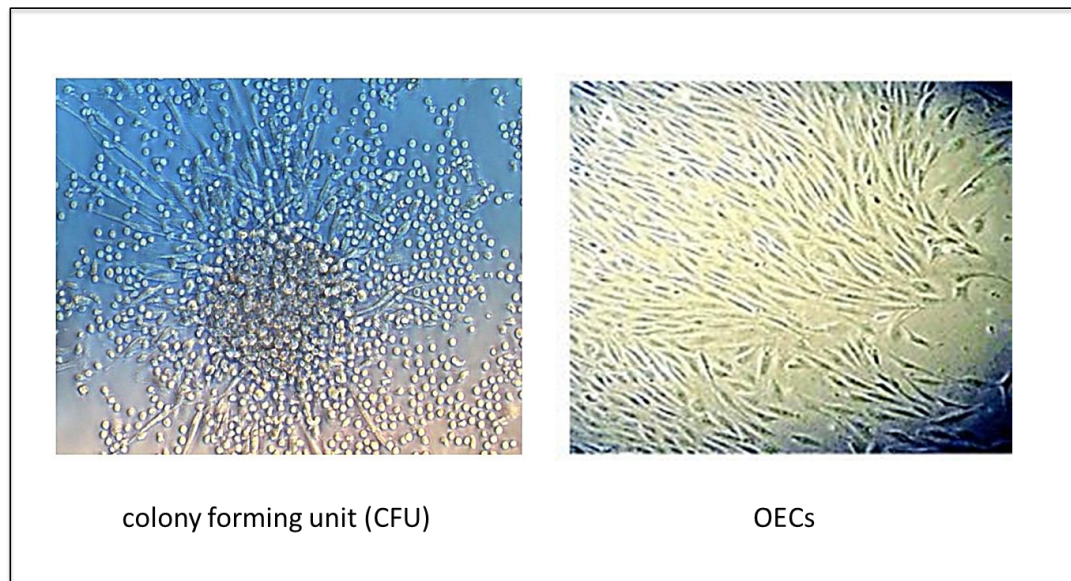


Abbildung 4: links: ein CFU - zentral runde Zellen, in der Peripherie die spindelförmigen EPCs [115]; rechts: OECs – gut sichtbar das kopfsteinartige Wachstumsmuster der EPCs, das typische Merkmal auch für reife ECs [5].

Frühe EPCs scheinen zum Großteil aus einer $CD14^+$ Population der mononukleären Zellen (MNCs) hervorzugehen, während OECs fast ausschließlich von $CD14^-$ MNCs abstammen [19, 116].

OECs haben bereits eine große Ähnlichkeit zu ausgereiften Endothelzellen, was sich auch in ihrer Antigenexpression (vWF, VE-cadherin, VEGFR-2) und NO-Produktion durch die endotheliale NO-Synthase widerspiegelt [19, 111-113]. Außerdem besitzen sie ebenfalls die Fähigkeit zur Ausbildung röhrenartiger Strukturen bei entsprechenden 3D-Assays *in vitro*. Im Gegensatz dazu unterscheiden sie sich von Endothelzellen aber durch eine hohe Proliferationsrate *in vitro* und ein höheres Potential zur Angiogenese *in vivo* [104].

Bei den frühen EPCs hingegen wird keine Röhrenbildung *in vitro* beobachtet und sie zeigen nur eine geringe NO-Produktion [112]. Dennoch haben auch sie Gemeinsamkeiten mit der endothelialen Zelllinie, so nehmen sie acetyliertes LDL auf und binden das Lectin UEA-1 [104]. Frühe EPCs weisen zwar nicht die beeindruckende Replikationsfähigkeit der OECs auf, dafür produzieren sie in hohem Maße verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine,

darunter VEGF, IL-8, HGF, G-CSF und GM-CSF [104].

Sowohl frühe EPCs als auch OECs scheinen gleichermaßen an der Angiogenese und an endothelialen Reparaturvorgängen beteiligt zu sein. So ergänzen sich die beiden Zelltypen, wobei die parakrinen Effekte der frühen EPCs die Proliferation von OECs und ihre Integration in neugebildete, wachsende oder deendothelialisierte Gefäße unterstützen [19, 112, 116].

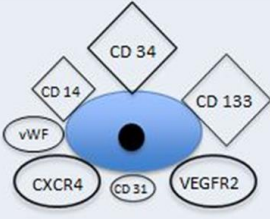
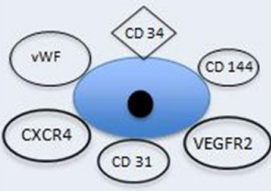
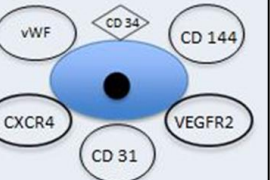
	Early EPCs	Late Outgrowth EPCS	Reife Endothelzellen
Eigenschaften in Kultur	Spindelförmig, CFU Erscheinen früh (<10 Tage) Überleben 4 Wochen Gering proliferativ	Kopfsteinpflasterartig Erscheinen spät (nach 14 Tagen) Überleben 12 Wochen Hoch proliferativ	Spindelförmig Mit zunehmender Passagezahl verlieren sie ihre Funktion
Expression von Oberflächenmarker			
Funktionelle Merkmale			
NO-Produktion	<+	+	+
Ac-LDL-Aufnahme	+	+	+
UEA-1-Bindung	+	+	+
Migration	+	+	+
Röhrenbildung	-	++	+
Neovaskulogenese	<+	+	-
Integration in Gefäße	+	++	-
Zytokin Produktion in Kultur	hoch	niedrig	niedrig

Abbildung 5: Early EPCs, OECs und reife Endothelzellen im direkten Vergleich bzgl. ihrer Eigenschaften in Kultur, Expression von Oberflächenmarkern und funktionellen Merkmalen (modifiziert nach [4]).

2.7.3. Ursprung der endothelialen Progenitorzellen

Wie in zahlreichen Transplantationsstudien bereits nachgewiesen, dient das Knochenmark als Quelle für Progenitorzellen aller Art und folglich auch für die endothelialen Progenitorzellen, die schließlich in reife Endothelzellen ausdifferenzieren können [19, 100]. Abgesehen davon wurde mittlerweile aber auch gezeigt, dass EPCs im zirkulierenden Blut auch einen anderen Ursprung haben können. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass isolierte mononukleäre Zellen aus der Milz, vorselektiert mit einem endothelspezifischen

Medium, deutlich endotheliale Merkmale zeigten. Ihre nachfolgende Transplantation verbesserte an verletzten Gefäßen die Reendothelialisierung und schränkte die Neointimabildung ein [117, 118].

Darüber hinaus konnten sowohl aus dem Darm als auch aus der Leber geweberesidente Stammzellen isoliert werden, welche die Neovaskularisation im Hinterlauf-Ischämiemodell positiv beeinflussten [8]. Außerdem wurden Stammzellen sowohl im Parenchym der Nierenrinde als auch im humanen Fettgewebe nachgewiesen, welche *in vitro* zu Endothelzellen ausdifferenzieren können [10, 11].

Ein reichhaltiges Depot für EPCs befindet sich interessanterweise auch innerhalb der Gefäßwand zwischen Media und Adventitia [9, 12]. Diesen Progenitorzellen scheint eine äquivalente Rolle zuzukommen wie den residenten Stammzellen anderer Gewebe und sie dürften aufgrund des ihnen zugeschriebenen regenerativen Potentials in Zukunft Gegenstand weiterer Forschung sein.

2.7.4. Therapieansätze mit EPC- Einsatzmöglichkeiten, Anwendung, Limitation

EPCs sind entscheidend an der Endothelialisierung und an der Neoangiogenese beteiligt [19, 100, 119], infolgedessen bergen diese Zellen ein großes therapeutisches Potenzial. So ist ihre Verwendung in der Gefäßheilung, Neovaskularisierung oder Regeneration von ischämischem Gewebe und der Besiedelung von Gefäßtransplantaten ein vielversprechender Ansatz bei der zukünftigen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen [120].

Darüber hinaus erwies sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender $CD34^{+}$ $CD133^{+}$ $VEGFR-2^{+}$ Zellen und der Neigung zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. So gilt ein Patient umso gefährdeter, je weniger endotheliale Progenitorzellen in dessen Kreislauf zirkulieren. Weiter ist bei Patienten, die bereits eine solche Erkrankung aufweisen, die Anzahl der EPCs deutlich erniedrigt [121-123].

Folglich stellt die Erhöhung der zirkulierenden EPCs im Blutkreislauf möglicherweise ein attraktives Therapieziel bei kardiovaskulären Erkrankungen dar und wird in vielen präklinischen und klinischen Studien weltweit untersucht. Prinzipiell lässt sich die Anzahl der Zellen über 2 Mechanismen erhöhen, entweder mittels Transplantation oder mittels endogener Mobilisierung.

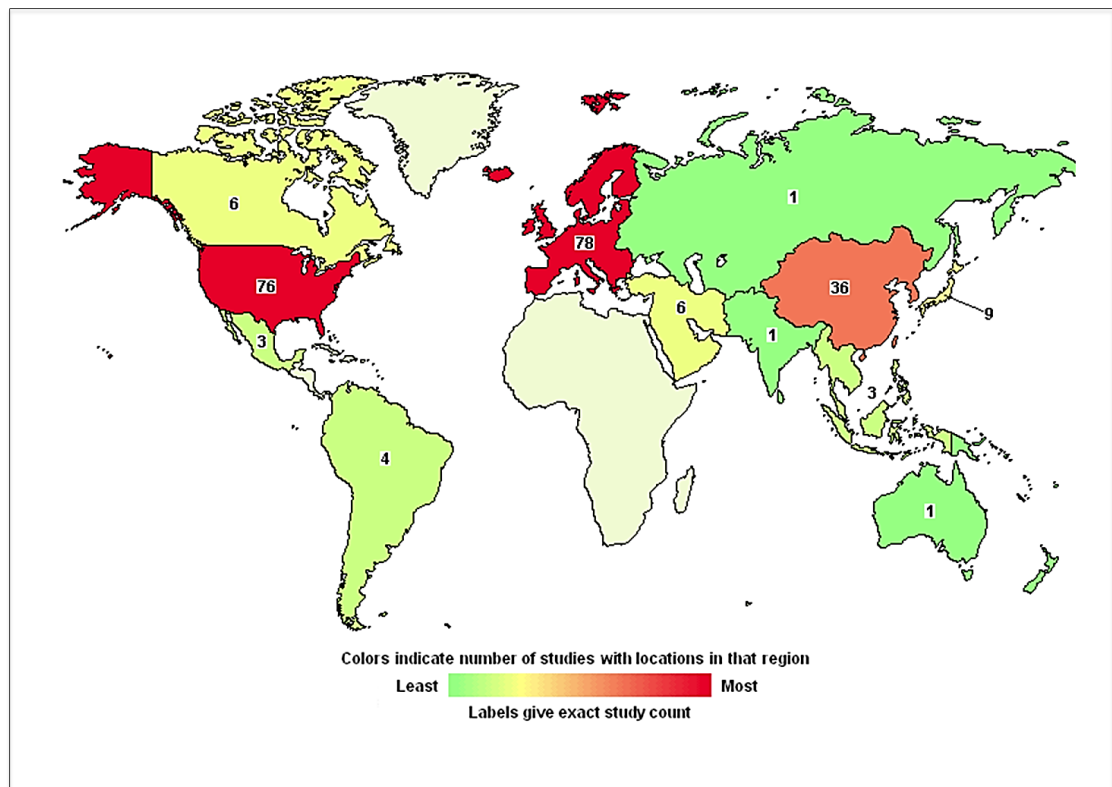


Abbildung 6: Verteilung aktueller klinischer Studien zum Thema EPCs in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankung (aus [124]).

2.7.4.1. Transplantation von endothelialen Progenitorzellen

In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von EPCs die Reendothelialisierung verletzter Gefäße unterstützt, der Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie entgegenwirkt und Ischämien günstig beeinflussen kann.

Hierfür wurden beispielsweise aus dem peripheren Blut von Kaninchen mononukleäre Zellen isoliert und in einem Endothelzellmedium kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen den Versuchstieren direkt nach Deendothelialisierung der Carotis lokal transplantiert. Nach 4 Wochen zeigte sich eine signifikant verminderte Neointimabildung aufgrund einer rascheren Reendothelialisierung gegenüber einer Kontrollgruppe mit nicht im Endothelzellmedium kultivierten mononukleärer Zellen [26].

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von Zhao, die Mäuse zunächst splenektomierte, aus der Milz mononukleäre Zellen isolierte und in einem Endothelzellmedium kultivierte. Die so gewonnenen EPCs wurden nach Carotid injury-OP in die Schwanzvene injiziert. Im Vergleich zu einer

untransplantierten Kontrollgruppe zeigten diese Tiere nach 1 Woche eine verbesserte Reendothelialisierung und nach 3 Wochen eine verminderte Neointimabildung [7].

In einem anderen Versuch konnte bei künstlichen Gefäßtransplantaten in der Carotis von Kaninchen durch EPC-Transplantation eine schnellere Endothelialisierung erzielt werden [6].

Auch auf dem Gebiet der Angiogenese wurden vielversprechende Ergebnisse mittels EPC-Transplantation erzielt. Dementsprechend wurde in einem Hintergliedmaßenischämie-Modell bei Mäusen eine gesteigerte Neoangiogenese nach Transplantation humaner EPCs beobachtet [125]. In einem Myokardinfarktmodell bei der Ratte wurde durch intravenöse Gabe humaner EPCs eine höhere Kapillardichte vergesellschaftet mit einer reduzierten Narbenbildung erreicht [126]. Weiter konnte im selben Modell gezeigt werden, dass durch direkte intramyokardiale Transplantation humaner CD34⁺ Zellen eine Verbesserung der Vaskularisation dosisabhängig erzielt werden kann [127].

Sowohl frisch isolierte als auch kultivierte EPCs wurden in klinischen Studien bereits untersucht. In der TOP-CARE-AMI Studie beispielsweise wurden kultivierte humane EPCs Patienten intrakoronar verabreicht, die kürzlich einen Myokardinfarkt erlitten. In der Folge wurde eine signifikant verbesserte linksventrikuläre Funktion beschrieben, was auf ein positiv beeinflusstes Remodeling zurückzuführen ist [128]. In der TACT-Studie wurden bei Patienten, die infolge der pAVK eine ein- oder beidseitige Beinischämie aufwiesen, autologe, mononukleäre Zellen in den *M. gastrocnemius* injiziert. Der Doppler-Index zeigte sich nach 4 Wochen signifikant verbessert verglichen mit der Kontrollgruppe, der lediglich Puffer injiziert wurde [129].

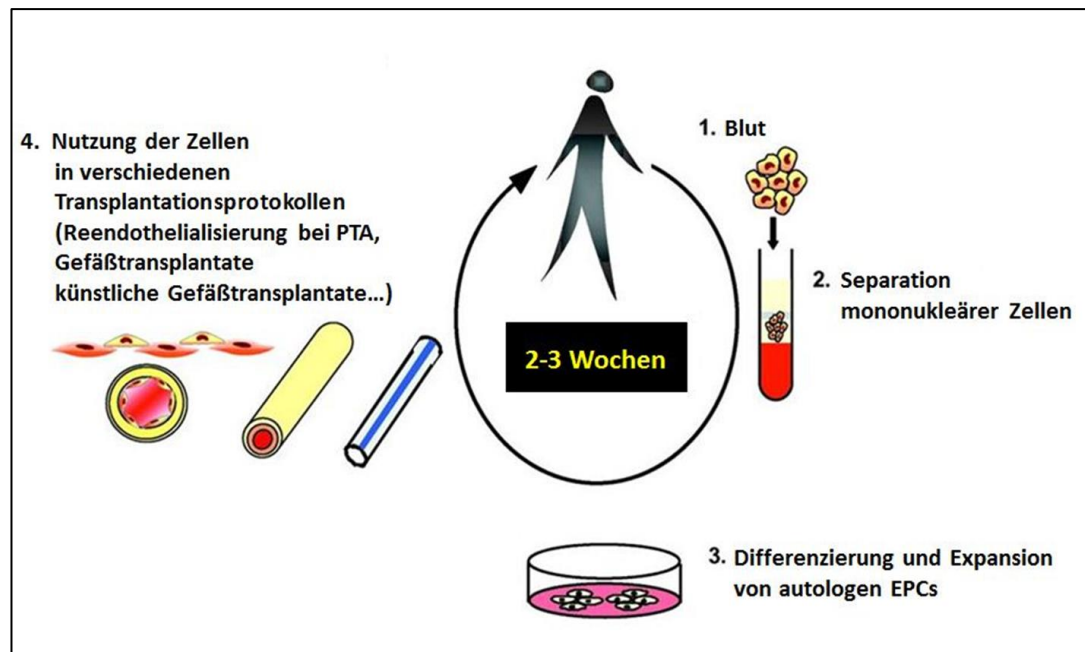


Abbildung 7: Denkbare Protokoll für eine zukünftige routinemäßige Verwendung von autologen EPC-Transplantationen in der Klinik: Isolierung und Kultivierung der endothelialen Progenitorzellen vor ihrem therapeutischen Einsatz (modifiziert nach [5]).

Obwohl präklinische und klinische Studien auf ein hohes Potenzial von transplantierten EPCs hindeuten, ist ihr klinischer Einsatz doch durch mehrere Faktoren limitiert. Die Ausgangsmenge an zirkulierenden EPCs ist sehr gering, was es schwierig macht die Population auf eine therapeutisch wirksame Anzahl in Kultur zu expandieren, ohne Gefahr zu laufen, Abweichungen im Phänotyp zu erhalten oder eine zelluläre Seneszenz zu begünstigen [101]. Auch die eindeutige Identifikation von EPCs gestaltet sich nach wie vor sehr schwierig, sodass weiterhin intensiv nach einem spezifischen EPC-Marker geforscht wird [4]. Darüber hinaus zeigen EPCs von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen häufig eine funktionelle Beeinträchtigung verglichen mit jenen gesunder Menschen [130-132]. Auch Alter und Diabetes mellitus gelten als Faktoren, die die Funktionalität der EPCs ungünstig beeinflussen [131, 133], sodass die EPCs solcher Patienten für eine autologe Transplantation u. U. nicht in Frage kommen. Bei der allogenen Transplantation steht die Problematik der Abstoßungsreaktion im Vordergrund.

2.7.4.2. Endogene Mobilisation von EPCs

Die Mobilisierung körpereigener EPCs ist neben der Transplantation ein vielversprechender Therapieansatz, nicht zuletzt da diese eine weniger invasive Methode darstellt.

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) halten sich im Knochenmark in der sogenannten Stammzellnische auf, einer hoch organisierten drei-dimensionalen Struktur, die aus Stromazellen und einer extrazellulären Matrix aufgebaut ist [134]. Die Retention am Knochenmark wird über adhäsive Interaktionen zwischen den Stammzellen und dem Stroma kontrolliert. Derselbe Mechanismus liegt auch dem Homing von Stammzellen zugrunde, auf das später noch genauer eingegangen wird [135]. Zwei Signalwege sind hierbei entscheidend: Zum einen die Interaktion zwischen dem vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und dem dazugehörigen Rezeptor auf der Stammzelloberfläche, dem Very Late Antigen-4 (VLA 4), zum anderen die Wechselwirkung zwischen SDF-1 α und dem C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4).

SDF-1 (stromal cell derived factor-1/CXCL12) ist ein hochpotenter chemischer Lockstoff für alle Stammzellen, die den CXCR4 Rezeptor auf Ihrer Oberfläche exprimieren [136]. Es wird in der Knochenmarksnische vom Stroma und vom Knochengewebe produziert und kommt im Allgemeinen in zwei Isoformen vor, α und β . Bereits während der embryonalen Entwicklung ist es an der Induktion der HPC-Wanderung von der fetalen Leber ins Knochenmark beteiligt [137]. Der chemotaktische Effekt des SDF-1 wird über den G-Protein-assoziierten Rezeptor CXCR4 vermittelt [136, 138, 139]. Durch die hohe Konzentration von SDF-1 im Knochenmark entsteht ein Gradient zwischen Knochenmark und peripherem Blut, der die Stammzellen im Knochenmark hält [140]. Unter physiologischen Bedingungen sind so die meisten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in ihrer Knochenmarksnische eingebettet und nur wenige zirkulieren im peripheren Blut [141]. Eine Änderung des Gradienten beispielsweise durch traumatisch bedingte Gewebsschädigung oder Ischämie, führt nachfolgend zu der sogenannten Mobilisierung der Zellen [140].

Auf dem Gebiet der Mobilisierung von Progenitorzellen wurde zunächst vor allem im Fachbereich der Hämatoonkologie intensiv geforscht, der insbesondere daran interessiert war, mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut zu ernten und diese anschließend als Knochenmarkstransplantat einzusetzen. Dieser

Forschung ist auch die Entdeckung des G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) zu verdanken, ein Zytokin, das typischerweise für die Mobilisierung CD34⁺ Stammzellen eingesetzt wird. Das verwandte Zytokin GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor) wird für denselben Zweck verwendet [100].

G-CSF gehört zur Familie der GM-CSF/IL-3/IL-5 Zytokine und wird von hämatopoetischen Zellen, aber auch von Stromazellen, Fibroblasten und Astrozyten produziert [142]. Aufgrund eines starken physiologischen und pathologischen Stresszustands wird G-CSF vermehrt freigesetzt, so beispielsweise auch bei einem akuten Myokardinfarkt [143-145]. Die entsprechenden Rezeptoren werden auf vielen hämatopoetischen Zelltypen exprimiert, dadurch können diese schnell und effektiv auf die veränderten Bedingungen reagieren [146]. Neben der Mobilisierung CD34⁺-Stammzellen dient G-CSF als wichtigster Regulator der Neutrophilenproduktion [147], ist essentiell bei der Granulopoese infolge bakterieller Infektionen [148] und hat darüber hinaus anti-apoptotische Effekte [149].

Zur Mobilisierung der Stammzellen stimuliert G-CSF die Expression von Proteasen wie Kathepsin G, Elastase und MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) in neutrophilen Granulozyten. Die Enzyme inaktivieren SDF-1 durch proteolytische Spaltung und es kommt so zu einer Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Interaktion [139, 150, 151]. Zusätzlich führt G-CSF zu einer verminderten Expression von SDF-1 im Knochenmark und CXCR4 auf den Stammzelloberflächen [152, 153]. Sowohl die gesteigerte Expression von Proteasen als auch die verminderte Expression von SDF-1 und CXCR4 bewirkt letztlich den Adhäsionsverlust der Zelle an die Nische und führt zu ihrem Eintritt in die Blutbahn. Der SDF-1/CXCR4-Signalweg kann also als Schlüsselement der Stammzell-Mobilisierung angesehen werden [134].

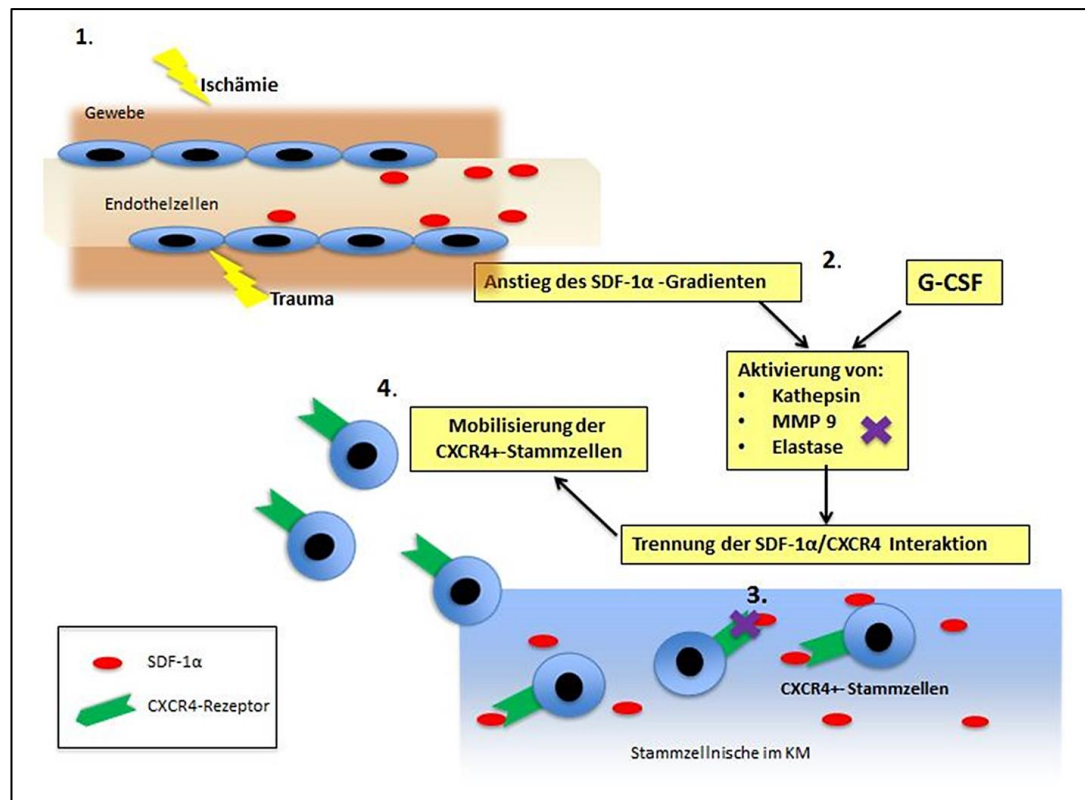


Abbildung 8: Die Mobilisierung von Stammzellen: 1. traumatisch oder ischämisch bedingt kommt es zu einem Anstieg des SDF-1α-Levels im Blut (rot) [140] und zu einer vermehrten endogenen G-CSF-Produktion [144] 2. eine Änderung des SDF-1α-Gradienten und G-CSF sind schließlich für den Adhäsionsverlust der CXCR4⁺-Stammzellen an die Knochenmarksnische (3.) verantwortlich [139, 147, 150, 151]; 4. dies führt zur Mobilisierung CXCR4⁺ endothelialer Progenitorzellen (grün) [134] (modifiziert nach [4])

Mit der G-CSF-Behandlung konnten in verschiedenen Forschungsarbeiten im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse erzielt werden im Hinblick auf Verhinderung der atherosklerotischen Progression, beschleunigte Reendothelialisierung und Vermeidung der Neointimabildung [154-156].

Neben G-CSF und GM-CSF lässt sich auch über die Gabe von EPO (Erythropoetin) und Östrogen die Mobilisierung von EPCs anregen [157, 158]. Weiter führt Östrogen zu einer Senkung der Apoptoserate von EPCs, indem es eine vermehrte Bildung von eNOS induziert [159].

Auch AMD 3100 gilt alleine oder synergetisch mit G-CSF eingesetzt dosisabhängig als ein potenter Stammzellmobilisator, da es als selektiver Antagonist zu SDF-1α an den CXCR4-Rezeptor von Stammzellen bindet.

Infolgedessen kann die Ankerfunktion der SDF-1/CXCR4-Achse in der Knochenmarksnische inhibiert werden, was zu einem Adhäsionsverlust der CD34⁺ Zellen an ihre Nische und letztlich zu ihrer Mobilisation führt [160-162]. In Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis und der Applikationsdauer kann so eine Stammzellmobilisation im Knochenmark oder auch eine Hemmung des Stammzellhomings im peripheren Blut vermittelt werden [29].

Als erstes atheroprotektives Medikament, das positiven Einfluss auf den EPC-Spiegel im Blut nahm, wurde die Stoffklasse der Statine entdeckt. Diese HMG-CoA Reduktase-Inhibitoren bewirkten zunächst *in vitro*, dann im Tiermodell und schließlich im Patienten mit fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung neben einem numerischen Anstieg der endothelialen Progenitorzellen auch ihre Aktivitätszunahme [163-165]. Weiter stimuliert die Gabe von Statinen den Einbau der Zellen in die deendothelialisierte Gefäßwand, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen positiv beeinflusst [166].

In weiteren Studien konnte auch gezeigt werden, dass peroxisome-proliferator-activated-receptor γ Agonisten (PPAR γ -Agonisten) die Fähigkeit haben, Anzahl und Adhäsionsfähigkeit der EPCs zu steigern und zudem ihre Alterung zu verlangsamen [167].

Dazu kann die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen durch verbesserte Lebensumstände begünstigt werden, beispielsweise durch regelmäßige Bewegung, keine Übergewichtigkeit und Verzicht auf Nikotinkonsum [4].

2.8. ROLLE DES SDF-1/CXCR4-SIGNALWEGS FÜR DIE MIGRATION VON STAMMZELLEN

Das zielgerichtete Anlocken zirkulierender Progenitorzellen und ihre nachfolgende Ansiedelung im geschädigten Gewebe werden zusammenfassend als „Homing“ bezeichnet. Bei diesem Prozess nehmen der CXCR4-Rezeptor und der chemotaktische Lockstoff SDF-1 α als dazugehöriger Ligand wie auch bei der Mobilisierung von Stammzellen eine zentrale Rolle ein.

Aufgrund hypoxischer oder traumatischer Schädigung erfolgt am Zielgewebe ein Expressionsanstieg des SDF-1 α [21, 168]. Diesem Vorgang liegt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) zugrunde, der sich

aus den beiden Untereinheiten HIF-1 α und β zusammensetzt und nur als Heterodimer funktionstüchtig ist [169-171]. HIF-1 wurde 1992 als verantwortlicher Faktor für die Expression von Erythropoetin unter hypoxischen Bedingungen entdeckt [171]. Seitdem gelang es, über 60 Gene zu identifizieren, die durch HIF-1 induziert werden, darunter auch SDF-1 α . Obwohl Hypoxie als der Hauptstimulus für die HIF-1-Aktivierung angesehen wird, wurden mittlerweile eine Reihe weiterer nicht-hypoxischer Stimuli entdeckt [21, 170, 172, 173]. Interessanter Weise sind die Mechanismen, die zu einer Aktivierung des HIF-1 unter hypoxischen und nicht-hypoxischen Bedingungen führen grundsätzlich verschieden.

Unter physiologischen, normoxischen Voraussetzungen wird die HIF-1 β -Untereinheit fortwährend exprimiert, die HIF-1 α -Untereinheit hingegen wird an zwei Prolylresten hydroxyliert und infolgedessen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) inaktiviert [21, 173]. Unter hypoxischen Bedingungen findet die Hydroxylierung mit nachfolgendem Abbau nicht mehr statt. Das somit stabilisierte HIF-1 α bindet daraufhin an HIF-1 β und gemeinsam bilden sie den aktiven HIF-1-Transkriptionsfaktor [173]. Die hypoxische HIF-1-Aktivierung und die dadurch verursachte SDF-1 α -Expression spielt beispielsweise beim Herzinfarkt eine große Rolle [17].

Im Gegensatz dazu beruht der Hauptmechanismus unter nicht-hypoxischen Bedingungen auf einem Anstieg der HIF-1 α -Transkriptionsrate und nachfolgend auf einer erhöhten HIF-1 α Translation, wodurch sich das Gleichgewicht von Synthese und Abbau zugunsten einer Akkumulation von HIF-1 α verschiebt, das so zur Bildung des aktiven Transkriptionsfaktors vermehrt zur Verfügung steht [171]. Vasoaktive Hormone, unter anderem Angiotensin II, Thrombin und Endothelin, aber auch Lipopolysaccharide (LPS), platelet-derived growth factor (PDGF) und TNF- α sind verantwortlich für den Anstieg der HIF-1 α -Transkriptionsrate [170, 171, 174]. Die erhöhte Transkription wird möglicherweise über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt, eine Kinase die bekanntermaßen die Sp1 Gentranskription stimuliert [173]. Die vermehrte HIF-1 α -Translation wird ebenfalls durch vasoaktive Hormone und LPS induziert, wobei hier der PI3 Kinase-Signalweg der maßgebliche Mechanismus zu sein scheint [171].

Bei einer Endothelschädigung kommt es nachfolgend zur Apoptose von Zellen

und zum Anstieg von apoptotischen Partikeln, Thrombin und platelet derived growth factor. Diese lösen die erhöhte HIF-1 α -Synthese aus und unterstützen so die Bildung des funktionstüchtigen Heterodimers HIF-1. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 bindet an einer spezifischen Bindungsstelle am SDF-1-Promotor und induziert dadurch die SDF-1-Expression [15, 21, 170, 172, 175].

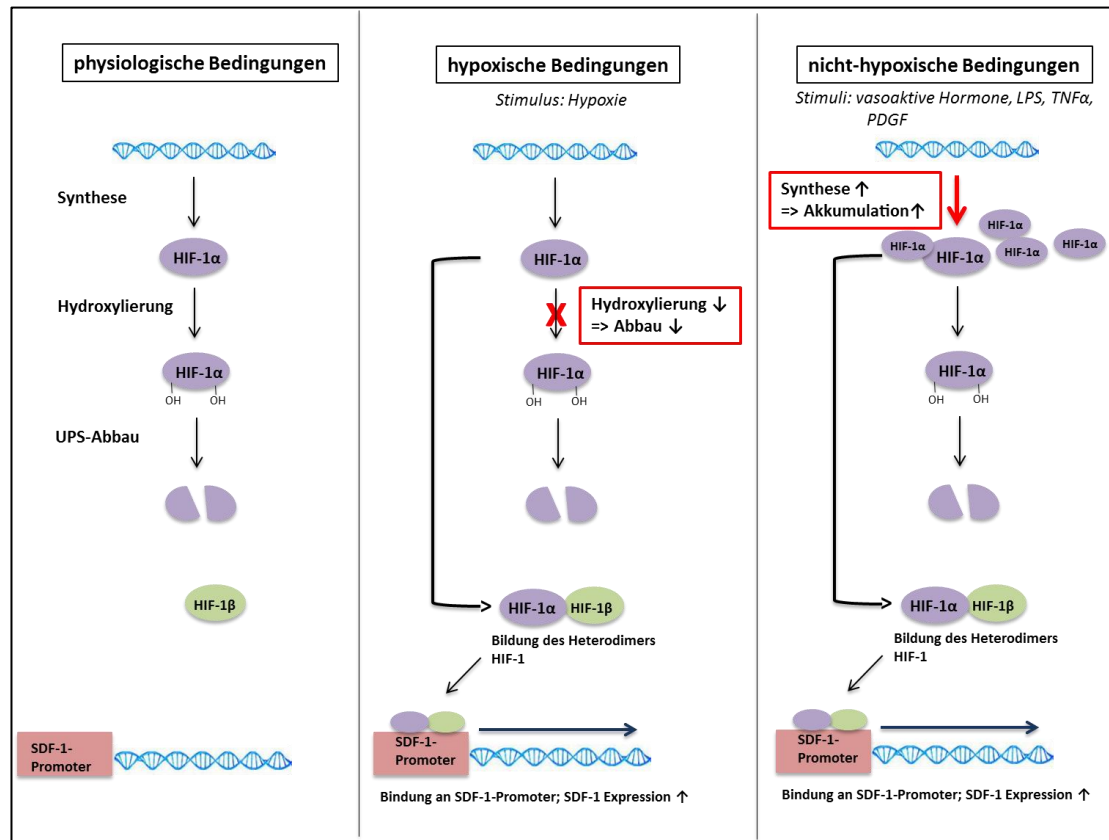


Abbildung 9: Die HIF-1 Bildung erfolgt unter physiologischen Bedingungen aufgrund des raschen Abbaus der HIF-1 α -Untereinheit durch das UPS nicht (links). Unter hypoxischen Voraussetzungen kommt es zu einer Stabilisierung des HIF-1 α , da seine Hydroxylierung mit nachfolgendem Abbau nicht mehr stattfindet; die anschließende Bindung an die HIF-1 β -Untereinheit führt zur Bildung des Transkriptionsfaktors HIF-1 und schließlich zu dessen Bindung an den Promotor des SDF-1-Gens. Dieser Prozess verursacht letztens den Anstieg der SDF-1-Expression (Mitte). Auch nicht-hypoxische Stimuli können einen Anstieg der SDF-1 Expression verursachen, allerdings wird hierbei die HIF-1 α -Untereinheit nicht über ihren verminderten Abbau, sondern über ihre erhöhte Synthese vermehrt zur Verfügung gestellt (rechts) (erstellt nach [171]).

SDF-1 α wurde erstmals aus Stromazellen des Knochenmarks isoliert [176], wird aber auch von zahlreichen anderen Zellen exprimiert [177]. So konnte nach der

Carotid injury-OP bei der Maus ein signifikanter Anstieg des SDF-1 α Spiegels innerhalb von 24 h in glatten Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells/SMCs) der Media gezeigt werden [15]. SDF-1 α wird auch von aktivierten Blutplättchen und Endothelzellen exprimiert [16-18]. *In vivo* konnte die Migrationsfähigkeit von EPCs gegen einen SDF-1 α -Gradienten dosisabhängig moduliert werden und *in vivo* wurde gezeigt, dass die lokale Applikation von SDF-1 α im Gewebe zu einer Akkumulation von EPCs führt [178]. In seiner aktiven Form (1-68 AS) bindet SDF-1 α an den CXCR4-Rezeptor von EPCs [25]. Als erstes gelang es Yin *et al.* einen eindeutigen Zusammenhang zwischen SDF-1 α -Expression, CXCR4⁺ EPCs und der Reendothelialisierung eines Endothelschadens darzustellen [179].

Im Zielgewebe wird SDF-1 α vornehmlich über die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4/CD26) reguliert. DPP IV ist eine membrangebundene und frei im Serum verfügbare extrazelluläre Peptidase und spaltet am N-Terminus von Proteinen ein Dipeptid ab, wenn diese an vorletzter Position ein Prolin (X-Pro) oder Alanin (X-Ala) aufweisen. Während SDF-1 α an der entscheidenden Stelle in der Aminosäurenkette die Aminosäure Prolin aufweist, befindet sich im Protein GLP-1, einem weiteren wichtigen Substrat der DPP IV, an dieser Position die Aminosäure Alanin.

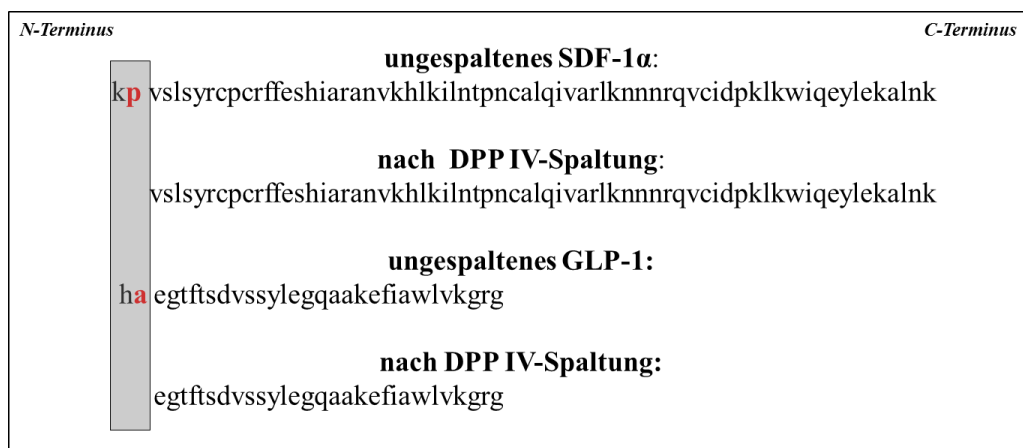


Abbildung 10: SDF-1 α und GLP-1 jeweils vor und nach DPP IV-Inaktivierung durch Abspaltung eines Dipeptids am N-terminalen Ende; die DPP IV-Spaltung erfolgt im Allgemeinen nach einem Prolin oder Alanin. Während SDF-1 α an der entscheidenden Position die Aminosäure (AS) Prolin aufweist (X-Pro), ist bei GLP-1 die AS Alanin (X-Ala) vorzufinden (modifiziert nach [23]).

DPP IV wird von vielen hämatopoetischen Zellen exprimiert, darunter Fibroblasten, CD34⁺ Stammzellen, Endothel- und Epithelzellen und ist in ihrer

katalytisch aktiven Form auch im Interstitium vorhanden [23, 180, 181].

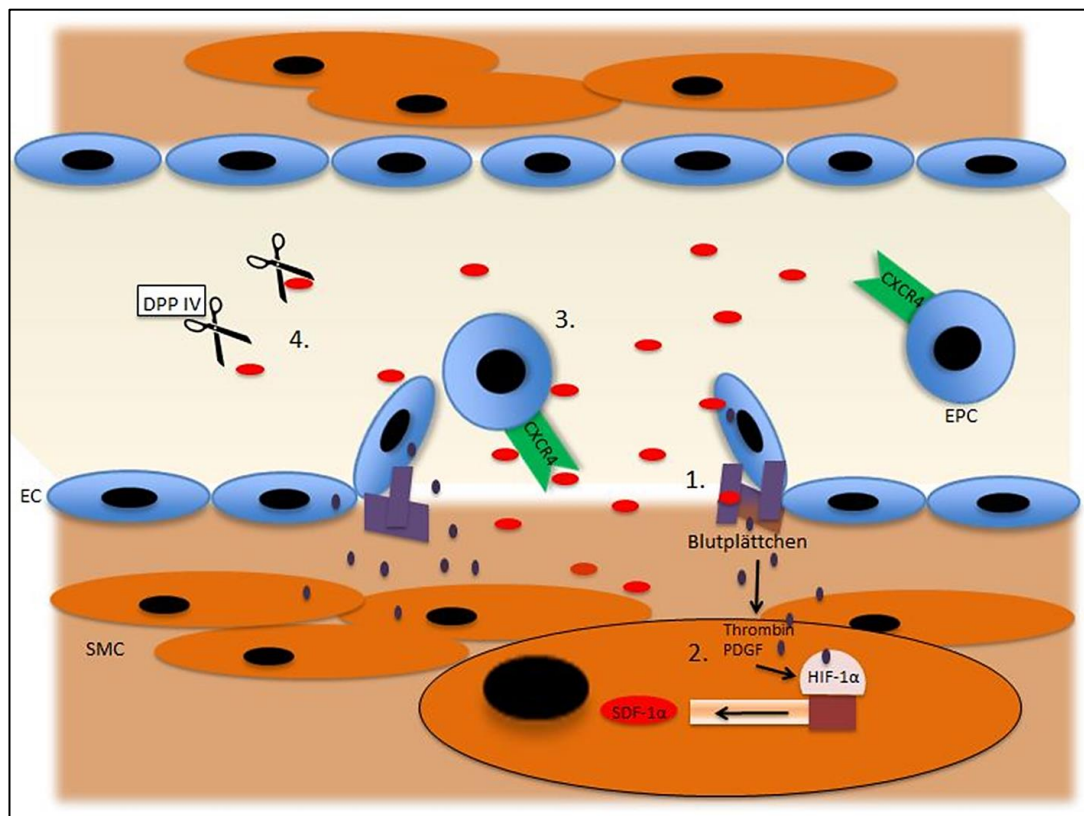


Abbildung 11: Einwanderung von endothelialen Progenitorzellen über die SDF-1α/CXCR4-Achse. 1. Am Endothelschaden lagern sich Blutplättchen an und sezernieren Thrombin sowie platelet derived growth factor; 2. diese aktivieren in SMC, Endothelzellen und Blutplättchen den nicht-hypoxischen HIF-1α Signalweg. Infolgedessen wird der Homingfaktor SDF-1α vermehrt exprimiert [15, 21, 175]; 3. CXCR4⁺EPCs migrieren schließlich zu dem Endothelschaden über eine CXCR4/SDF-1α-Interaktion [25]; 4. SDF-1α wird von der DPP IV inaktiviert [23, 180] (modifiziert nach [168])

Eine Stabilisierung des SDF-1α durch Hemmung der DPP IV stellt einen attraktiven Therapieansatz dar. So kann dadurch mobilisierten oder transplantierten Progenitorzellen eine zielgerichtete Migration an die verletzte Stelle erleichtert werden. Erste durchschlagende Erfolge mit diesem Konzept konnten im Myokardinfarktmodell bei der Maus gezeigt werden, in dem durch die Gabe des DPP IV-Inhibitors Diprotin A ein gesteigertes Homing CXCR4⁺ Stammzellen in das Infarktareal beobachtet werden konnte. Aufgrund des gesteigerten Remodelings durch die eingewanderten Zellen zeigte sich eine deutliche Reduktion des Narbengewebes. Dies führte schließlich zu einer

verbesserten Pumpfunktion und zu gesteigerten Überlebensraten [23, 29]. Ein weiterer DPP IV-Inhibitor, der bereits klinisch in der Typ 2 Diabetes-Therapie Anwendung findet, umfasst die Stoffklasse der Gliptine, darunter u.a. Sitagliptin und Vildagliptin. Sitagliptin ist seit 2007 auf dem deutschen Markt, Vildagliptin erhielt kurze Zeit später seine Zulassung. Beide oralen Antidiabetika zielen in der Diabetesbehandlung auf die Verlängerung der Halbwertszeit des GLP-1 ab, das von den intestinalen L-Zellen infolge der Nahrungsaufnahme sezerniert wird und im Glucosestoffwechsel eine tragende Rolle einnimmt. So hemmt zirkulierendes GLP-1 die Glucagon-Sekretion und unterstützt gleichzeitig durch Bindung an GLP-1-Rezeptoren auf β -Zellen des Pankreas die glucoseabhängige Insulin-Biosynthese und -Freisetzung. Außerdem unterstützt GLP-1 Insulin-unabhängig die Glucoseaufnahme von Kardiomyozyten. Darüber hinaus verzögert GLP-1 die Magenentleerung, indem es die Motilität des Gastrointestinaltrakts herabsetzt [181, 182], wirkt appetitzügelnd [183] und hat antiapoptotische Effekte [182]. GLP-1 wird von der DPP IV innerhalb von Minuten inaktiviert. Durch die Gabe von Sitagliptin oder Vildagliptin lässt sich diese kurze Halbwertszeit deutlich erhöhen [184].

2.9. BETEILIGUNG DES SDF-1/CXCR4-SIGNALWEGES BEI DER REENDOTHELIALISIERUNG UND RESTENOSE

Im Zusammenhang mit einer Restenose wird von einigen Autoren nicht nur die Proliferation von residenten glatten Gefäßmuskelzellen und der extrazellulären Matrix für die Neointimalbildung verantwortlich gemacht, sondern auch das Einwandern von smooth muscle progenitor cells (SPCs) am Endotheldefekt [15, 16, 185, 186]. Hierbei soll die SDF-1 α /CXCR4-Achse einen entscheidenden Beitrag leisten [15, 16, 186]. So konnte mit neutralisierenden Antikörpern gegen SDF-1 α eine geringere SPC-Rekrutierung und Neointimabildung beobachtet werden [15, 16]. Derselbe Effekt wurde bei *ApoE*^{-/-}-Mäusen gezeigt, nachdem ihr Knochenmark mit fetalen hämatopoetischen Stammzellen aus *Cxcr4*^{-/-}-Mäusen ersetzt wurde [16].

Aber ebenso scheint die SDF-1 α /CXCR4-Achse durch Rekrutierung von EPCs eine schnellere Reendothelialisierung zu begünstigen [20, 179], worin nach vielen Autoren der Schlüssel zur Vermeidung einer Restenose liegt [27, 28, 86, 187,

188].

So konnten mit einer Unterstützung der SDF-1 α /CXCR4-Achse auch sehr vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien erzielt werden. Bei Mobilisierungsversuchen mit G-CSF konnte eine signifikant verbesserte Reendothelialisierung von Endothelschäden gegenüber Kontrollgruppen gezeigt werden [154, 156] und die Neointimabildung war deutlich reduziert [155, 156]. Ebenso führte die Verabreichung eines Gliptins zu einer verminderten neointimalen Hyperplasie nach Carotisschaden [189].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die SDF-1 α /CXCR4-Achse Einfluss auf die Rekrutierung sowohl von SPCs als auch von EPCs nimmt. Während die SPCs entscheidend an Neointimabildung und Restenose beteiligt zu sein scheinen, dienen die EPCs wesentlich der Reendothelialisierung und wirken so der intimalen Hypertrophie entgegen [190]. Diese recht gegensätzliche Wirkung des SDF-1 α /CXCR4-Signalwegs lässt noch viele Fragen unbeantwortet und muss weiterhin Gegenstand der Forschung sein, um den zugrundeliegenden Mechanismus vollkommen zu entschlüsseln und ihn zukünftig für therapeutische Zwecke gezielt einsetzen zu können.

III. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Der intensiven Forschung in den letzten Jahren ist es zu verdanken, dass rasante Fortschritte auf dem Gebiet der interventionellen Revaskularisation gemacht wurden. Dennoch besteht weiterhin das Risiko einer Restenose infolge intimaler Hyperplasie. Ein Schlüsselement in der Entwicklung dieser Komplikation ist der verursachte Endotheldefekt während des Eingriffs [27, 28] (s. 2.4.).

Folglich ist ein vielversprechender Therapieansatz, eine möglichst rasche Reendothelialisierung zu fördern. Hierbei leisten die endothelialen Progenitorzellen (EPCs) einen entscheidenden Beitrag. So konnten sowohl bei der Transplantation von EPCs als auch bei ihrer medikamentösen Mobilisierung beispielsweise durch G-CSF signifikante Erfolge im Hinblick auf eine rasche Reendothelialisierung und infolgedessen für eine reduzierte intimale Hyperplasie erzielt werden (s. 2.6.4).

Eine zentrale Rolle bei der zielgerichteten Rekrutierung von EPCs zum Endothelschaden nimmt das Zytokin SDF-1 α ein, das den CXCR4⁺ EPCs als chemotaktischer Lockstoff dient und von der DPP IV enzymatisch inaktiviert wird. DPP IV kann unter anderem durch die Stoffklasse der Gliptine, die aus der Diabetestherapie bekannt sind, inhibiert werden (s. 2.7).

Ziel dieser Arbeit ist es nun zu untersuchen, welchen Einfluss der SDF-1 α /CXCR4-Signalweg am verletzten Endothel nimmt und wie dieser therapeutisch genutzt werden kann. Mäusen wird hierfür mittels Carotid-injury-Methode ein Endothelschaden zugefügt und anschließend werden diese Tiere je nach Versuch und Gruppe einzeln oder in Kombination mit G-CSF und/oder Gliptinen (Sitagliptin bzw. Vildagliptin) behandelt. Dabei soll insbesondere auf folgende Fragestellungen Wert gelegt werden:

- Welche Rolle spielt die SDF-1 α /CXCR4-Achse am geschädigten Endothel und welchen Effekt hat das Verabreichen von Gliptinen auf SDF-1 α selbst und nachfolgend auf die Migration CXCR4⁺ Knochenmarkszellen am verletzten Endothel?
- Inwieweit lässt sich die Reendothelialisierung durch eine Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse begünstigen?
- Ist der SDF-1 α /CXCR4-Signalweg der entscheidende Mechanismus bei der Reendothelialisierung?

IV. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

4.1. VERSUCHSTIERE

4.1.1. Gesetzliche Rahmenbedingungen

Die Tierversuche wurden gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchGesetz) durchgeführt und entsprechend von der Regierung von Oberbayern (GZ 55.2-1-54-2531-146-10; 55.2-1-54-2531-34-12) genehmigt. Die chirurgischen Eingriffe fanden in dem dafür vorgesehenen Operationsraum der Medizinischen Klinik und Poliklinik I im Klinikum Großhadern statt (Forschungslabor B, Raum U1 312).

4.1.2. Eingesetzte Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche C57BL/6N Mäuse verwendet im Alter von 8-10 Wochen mit dem entsprechenden Körpergewicht von 20-25 g. Die Tiere stammten allesamt von Charles River in Sulzfeld. Der Inzuchtstamm geht auf C.C. Little zurück, der die Mäuse ursprünglich von Abbie Lathrop erhielt und ausgehend von dem C57BL-Stamm 10 Teillinien schuf, wobei der Sechsten die größte Bedeutung zukommen sollte und diese 1937 separiert wurde. Charles River erhielt den Stamm dann 1974 [191].

4.1.3. Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung der medizinischen Klinik und Poliklinik in Großhadern in einem offenen Haltungssystem untergebracht. Noch nicht operierte Mäuse wurden in Standardkäfigen Typ II long bis zu einer Maximalgruppengröße von 4 Tieren zusammengesetzt. Eine regelmäßige Kontrolle der Tiere sowie Reinigung der Käfige verbunden mit Einstreuwechsel war sichergestellt. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus war durch ein Lichtprogramm vorgegeben. Die Raumtemperatur lag zwischen 19 und 21°C und die Luftfeuchtigkeit betrug ca. 50 %. Den Tieren wurden ungebleichter Zellstoff als Nistmaterial sowie Pappröhren angeboten. Der Hygienestatus orientierte sich an den Vorgaben von FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), sodass Sensortiere in regelmäßigen Intervallen auf speziesrelevante Pathogene untersucht

wurden und falls nötig entsprechend reagiert werden konnte. Von der Narkose erholten sich die Tiere bis zum vollständigen Erwachen in Einzelhaltung bevor sie wieder vergesellschaftet wurden.

4.2. MATERIAL

4.2.1. Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel, Substanzen

Die aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in der höchsten Reinheitsstufe (p.A.- Qualität) vom Hersteller bezogen.

Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	B Braun, Melsungen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase Type IV	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol 75%, 95%	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 4%	Microcos, Garching
H ₂ O destil.	Millipore, Billerica, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B Braun, Melsungen
Sodiumbicarbonat	Roth, Karlsruhe

4.2.2. Pharmaka

AMD3100 octahydrochloride hydrate	Sigma- Aldrich, St Louis, USA
Buprenorhinhydrochlorid (Temgesic®)	Essex Pharma, München
Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe)	Bayer Vital, Leverkusen
Neupogen 30 (Filgrastim Hexal®)	Hexal, Holzkirchen
Heparin-Natrium 25 000 I.E./ 5ml	B Braun, Melsungen

Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa 5%)	Inresa, Freiburg
Sitagliptin (Januvia® 100 mg)	Merck Sharp & Dohme Ltd., Hertfordshire, UK
Vildagliptin (Galvus ® 50 mg)	Novartis, Horsham, UK
Xylazinhydrochlorid (Rompun ® 2%)	Bayer, Leverkusen

4.2.3. Operationszubehör für das elektrische Carotid injury-Modell

Antiseptikum (Octenisept®)	Schülke&Mayer, Norderstedt
Bipolare Pinzette (abgewinkelt; 16,5 cm, Spitze 1mm; stumpf)	Erbe, Tübingen
Braunol®	B Braun, Melsungen
Cellulose-Tupfer (Maicell XT®)	MaiMed, Neuenkirchen
Chirurgisches Operationsbesteck	FST, Heidelberg allgaier instrumente, Frittlingen
Handschuhe unsteril (Peha-soft®)	Paul Hartmann, Heidenheim
Haarentfernungs-Creme (veet)	Reckitt Benckiser, Mannheim
Infrarotlampe	Petra, Geislingen/Steige
Intraoperatives Tierbewärmungssystem	FMI, Seeheim/OB
Medizinische Pflaster (Durapore) 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Microlance 3 Injektionskanülen 0,3 x 13 mm und 0,9 x 40mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Nahtmaterial (Prolene)	Ethicon, Norderstedt
Saugtupfer steril (Sugi®)	Kettenbach, Eschenburg
Spritzen 1 ml BD Plastipak	Becton Dickinson, Heidelberg

Spritzen 1 ml BD Micro-Fine	Becton Dickinson, Heidelberg
Stereomikroskop Leica A60 S	Leica, Wetzlar
Steuerungseinheit der bipolare Pinzette (VIO 50 C) mit Fußschalter	Erbe, Tübingen
Vaseline (Vaselinum Album)	Fagron, Barsbüttel
Wattestäbchen	dm, Karlsruhe

4.2.4. Zubehör für das Reendothelialisierungs-Assay

Deckgläser 24x 50 mm	Gerhard Menzel, Braunschweig
Evans Blue	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig
Mikrochirurgische Schere	FST, Heidelberg
Spritze 50 ml BD Perfusion	Becton Dickinson, Heidelberg
Vitro-Clud®	Langenbrinck, Emmendingen

4.2.5. Laborgeräte und sonstige Materialien

Autoklav Varioklav Dampfsterilisation	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Cell strainer 70 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Chemikalienlöffel	Roth, Karlsruhe
EDTA-Röhrchen 1,3 ml	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf-Röhrchen 200 µl/1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank Hera freeze -80 °C	Heraeus Holding, Hanau
Kühlschrank/Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop, Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Nanodrop 2000, Spectrophotometer	PEQLAB, Erlangen
Ofen	Heraeus Holding, Hanau
Pipetten 2,5/20/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Petrischale Steriplan	Roth, Karlsruhe
Ultraschallhomogenisator	Bandelin electronic, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific industries, New York, USA
Waage 400g Scout Pro	Ohaus , Nänikon, Schweiz
Zentrifuge Hettich EBA 12R	Hettich, Bach, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
24-well Platte, tissue culture plate	Becton Dickinson, Heidelberg

4.2.6. Zubehör für die FACS-Analyse

Antikörper (Alexa Fluor® 647 anti-mouse CD184 (CXCR4))	BioLegend, San Diego U.S.A.
Collagenase I	Life technologies, Darmstadt
FACS-Analysegerät	Becton Dickinson FACSCalibur, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	VWR, Radnor, Pennsylvania, U.S.A.
Optimem I-Medium	Invitrogen, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Darmstadt
Polypropylen-Rundbodenröhrchen	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
TC-Platten, 6-well	TPP, Trasadingen, Schweiz

4.2.7. Zubehör für die quantitative Real-time RT-PCR

Cycler My IQ Single color RT PCR Detection System	BioRad, München
DNase I Amplification Grade Kit	Invitrogen, Darmstadt
IQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
Microseal `B` Seal-Film	BioRad, München

Omniscript RT- Kit	Qiagen, Hilden
PeqGOLD TriFast	Peqlab, Erlangen
96-well PCR-Platten nm skited	BioRad, München

4.2.8. Zubehör für die Massenspektrometrie

Acetonitril	Roth, Karlsruhe
IP-Puffer	Roth, Karlsruhe
Protein G Sepharose	GE Healthcare, USA
Rekombinantes murines SDF-1 α	PrepoTech, Hamburg
SDF-1 α -Antikörper (anti-h/mCXCL12)	R&D Systems, Abingdon, UK
TFA	Roth, Karlsruhe
Wasser für Chromatographie	Merck, Darmstadt

4.2.9. Hard- und Software

Axion Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena
Data Explorer	Applied Biosystems, Framingham, USA
Image J	Open source software
Microsoft Windows 7 ultimate	Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA
iQ5 Optical System Software	BioRad, München

4.3. METHODEN

4.3.1. Carotid injury-Modell

4.3.1.1. Versuchsdurchführung

Die zu operierende Maus wurde aus ihrem Käfig entnommen und gewogen. Zunächst wurde zur analgetischen Versorgung eine gewichtsorientierte Dosis

Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg) intraperitoneal verabreicht. Weiter wurde eine Kombinationsnarkose aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg) und Xylazinhydrochlorid (20 mg/kg) entsprechend des Gewichts intraperitoneal appliziert. Nach etwa vier Minuten trat das chirurgische Toleranzstadium ein. Das Tier wurde auf eine selbstregulierende Wärmeplatte in Rückenlage mittels Klebestreifen an den Gliedmaßen fixiert. Der Oberkiefer wurde mit einem Gummiband in Lage gebracht, um einen optimalen Operationszugang am gestreckten Hals zu ermöglichen. Anschließend wurde der Messfühler der Wärmeplatte rektal eingeführt, wodurch während der gesamten Operation eine konstante Körpertemperatur der Maus von 37,5 °C beibehalten werden konnte. Um die Cornea vor Austrocknung zu schützen, wurde Augensalbe aufgetragen. Danach wurde das Operationsfeld enthaart und mit Braunol® desinfiziert. Die Haut wurde von caudal, beginnend zwischen den beiden Vordergliedmaßen, nach cranial bis kurz vor dem Unterkiefer über eine Länge von ca. 13 mm inzidiert. Die Wundränder wurden mobilisiert, die *Glandula mandibularis* anatomisch stumpf durchtrennt, der linke Anteil zur Seite geklappt und durch Auflegen einer Pinzette in Lage gehalten. Der linke *M. sternocleidomastoideus* (schräger Halsmuskel) wurde mit einem Faden umstochen, zur Seite gezogen und die Fadenenden mittels Klebestreifen fixiert, sodass die darunterliegende Carotisscheide zugänglich war. Die linke *Arteria carotis communis* wurde unter Schonung des *Nervus vagus* und der *Vena jugularis interna* aus der gemeinsamen, bindegewebigen Hülle präpariert. Im Anschluss wurde die Deendothelialisierung durchgeführt, indem eine bipolare Pinzette (1 mm) an die Carotis angelegt wurde (2 Watt für ca. 0,5 Sekunden). Aufgrund der Koagulation löste sich die innerste Gefäßschicht ab, was von außen durch ein Abblassen und ein vermindertes Pulsieren des Gefäßes sichtbar wurde. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, um eine Gesamtverletzungsstrecke von exakt 4 mm zu erhalten. Anschließend wurde der Fadenzug vom *M. sternocleidomastoideus* gelöst, die *Glandula mandibularis* über die Carotisscheide zurückgeklappt und die Hautwunde durch eine einfachfortlaufende Naht wieder verschlossen. Abschließend wurde die OP-Fläche mit Braunol® desinfiziert. Die Tiere wurden in einen frischen Käfig mit Nestbaumaterial zurückgesetzt und bis zum Erwachen unter Rotlicht gehalten. Die Analgesie erfolgte mittels Buprenorphin (0,5-1 mg/kg) alle 12 Stunden über einen Zeitraum von 3 Tagen.

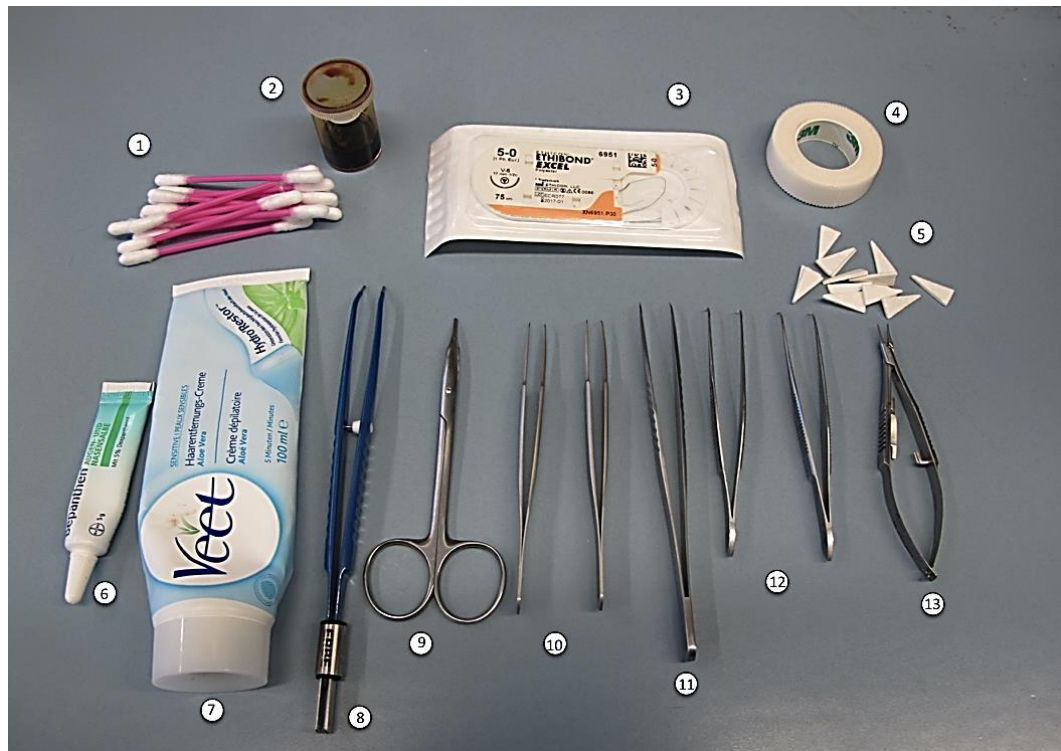


Abbildung 12: Operationszubehör für das Carotid injury-Modell: 1 Wattestäbchen, 2 Braunol®, 3 Prolene-Faden, 4 Durapore (Klebestreifen), 5 Saugtupfer, 6 Bepanthen®-Augensalbe, 7 Haarentfernungs-Creme, 8 bipolare Pinzette, 9 Schere, 10-12 verschiedene Pinzetten, 13 Nadelhalter

4.3.1.2. Behandlung mit AMD 3100, G-CSF Sitagliptin und Vildagliptin

Die Tiere erhielten ihren Gruppen entsprechend AMD 3100, G-CSF oder NaCl-Lösung (0,9%), diese Substanzen wurden allesamt intraperitoneal verabreicht.

AMD 3100 wurde zu 1,25 mg/kg [29] in 50 µl Aqua ad iniectabilia gelöst und einmal täglich appliziert, beginnend am Tag der OP bis zur Entnahme der Carotis. AMD 3100 dient in höheren Dosierungen üblicherweise als Stammzellmobilisator aufgrund seiner antagonistischen Wirkung auf den CXCR4-Rezeptor (s. 2.6.4.2). Theiss *et al.* gelang es über durchflusszytometrische Analysen jene Dosis zu bestimmen (1,25 mg/kg), mit der zwar die SDF-1α/CXCR4-Achse am Zielgewebe durch Inhibition des CXCR4-Rezeptors unterbrochen wird, gleichzeitig aber die Stammzellmobilisierung im Knochenmark durch AMD 3100-Gabe nahezu unbeeinflusst bleibt [29].

G-CSF wurde in einer Dosierung von 100 mg/kg in 50 µl Glucose gelöst und ebenfalls einmal täglich gespritzt, beginnend am OP-Tag bis zur Entnahme. Alle anderen Gruppen erhielten einmal täglich 50 µl NaCl-Lösung (0,9%).

Vilda- bzw. Sitagliptin wurde über das Futter verabreicht. Hierzu wurden die jeweiligen Tabletten an den Futtermittelhersteller ssniff geschickt, der diese zerkleinerte und anschließend in die Pellets des Normalfutters einarbeitete. Das Mischungsverhältnis wurde dabei so gewählt, dass eine Dosierung von 500 mg/kg Körpergewicht täglich [192] gewährleistet war.

4.3.1.3. Carotis-Entnahme und Fixierung bzw. Vorbereitung für weitere Analysen

Zunächst wurden die Tiere gewichtsabhängig mit Ketamin/Xylazin i.p. narkotisiert. Sobald die Mäuse die angemessene Narkosetiefe erreicht hatten, wurden sie einzeln aus ihrem Käfig entnommen und mittels CO₂ schmerzlos getötet.

Im Anschluss wurde die Maus auf dem Rücken liegend an den Gliedmaßen mit Klebestreifen fixiert und der Oberkiefer mit einem Gummiband in Lage gebracht, um einen optimalen Zugang zu der *Arteria carotis* sicherzustellen. Nachfolgend wurde die Haut im Halsbereich in der Medianen vom Unterkiefer bis zwischen die beiden Vordergliedmaßen eröffnet, die beiden Speicheldrüsen stumpf durchtrennt und die linke Speicheldrüse abgesetzt. Der linke *M. sternocleidomastoideus* wurde mit einer Nadel-Faden-Kombination umstochen und so zur Seite fixiert. Erneut wurde die linke *A. carotis communis* freipräpariert und mit Hilfe einer mikrochirurgischen Schere kranial oberhalb der Carotisbifurkation einerseits und kaudal im Bereich des unverletzten Carotisabschnitts großzügig abgesetzt.

Die gewonnene Gewebeprobe wurde bis zur weiteren Aufbereitung für einige Sekunden in eine Petrischale mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) verbracht, um sie so von Blutresten zu reinigen.

4.3.2. Quantitative Real-time RT-PCR

4.3.2.1. Prinzip der quantitativen Real-time RT-PCR

Die Methode der Real-time RT-PCR erlaubt eine quantitative Aussage über die mRNA-Expressionslevel (messenger Ribonucleinsäure) einzelner Transkripte in einer Probe.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Polymerasenkettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), mit der sich eine DNA-Zielsequenz exponentiell vervielfältigen lässt. Für den Ablauf dieser Reaktion müssen der bekannten

Zielsequenz das flankierende Primerpaar, die *Taq*-Polymerase (hitze stabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*) und die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate in einem geeigneten Puffer zugegeben werden.

Die Reaktion läuft in drei Schritten ab, die zusammenfassend als Amplifikationszyklus bezeichnet werden:

1. *Strangtrennung*: Die Probe wird auf $> 90^{\circ}\text{C}$ erhitzt, dadurch wird der DNA-Doppelstrang getrennt, der sich aus dem sogenannten *sense* und *antisense* Strang zusammensetzt.
2. *Hybridisierung der Primer*: Die Probe wird nun auf die errechnete Annealingtemperatur abgekühlt, sodass sich die Primer sequenzspezifisch an die Einzelstränge der DNA-Matrize anlagern.
3. *DNA-Synthese (Elongationsphase)*: Die Probe wird im letzten Schritt auf 72°C erhitzt, was dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase entspricht. Diese verlängert die Primersequenzen in Richtung $5'$ zu $3'$ an beiden Strängen.

Dadurch erhält man nach dem ersten Amplifikationszyklus aus einem Doppelstrang zwei reverse-komplementär ergänzte Stränge [193].

Für die quantitative Real-time RT-PCR muss die mRNA zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Die Quantifizierung kann beispielsweise wie in dieser Arbeit über die Detektion des Farbstoffs SYBR green während der PCR erfolgen. SYBR green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit sehr hoher Affinität in doppelsträngige DNA interkaliert und der gebunden bei gleichbleibender Anregung um ein Vielfaches stärker fluoresziert als im ungebundenen Zustand. Da die Fluoreszenz proportional mit den PCR Produkten eines Zyklus zunimmt, kann anhand der gemessenen Fluoreszenz am Ende der Elongationsphase auf die amplifizierte Ausgangsmenge der cDNA und somit auf die ursprüngliche Menge der eingesetzten Transkripte rückgeschlossen werden. Für die Quantifizierung werden nur die Zyklen eines vollständigen Real-time PCR Laufs herangezogen, die sich in der exponentiellen Phase dieses befinden, da hier optimale Reaktionsbedingungen vorzufinden sind und folglich die Amplifikationseffizienz nahezu konstant ist.

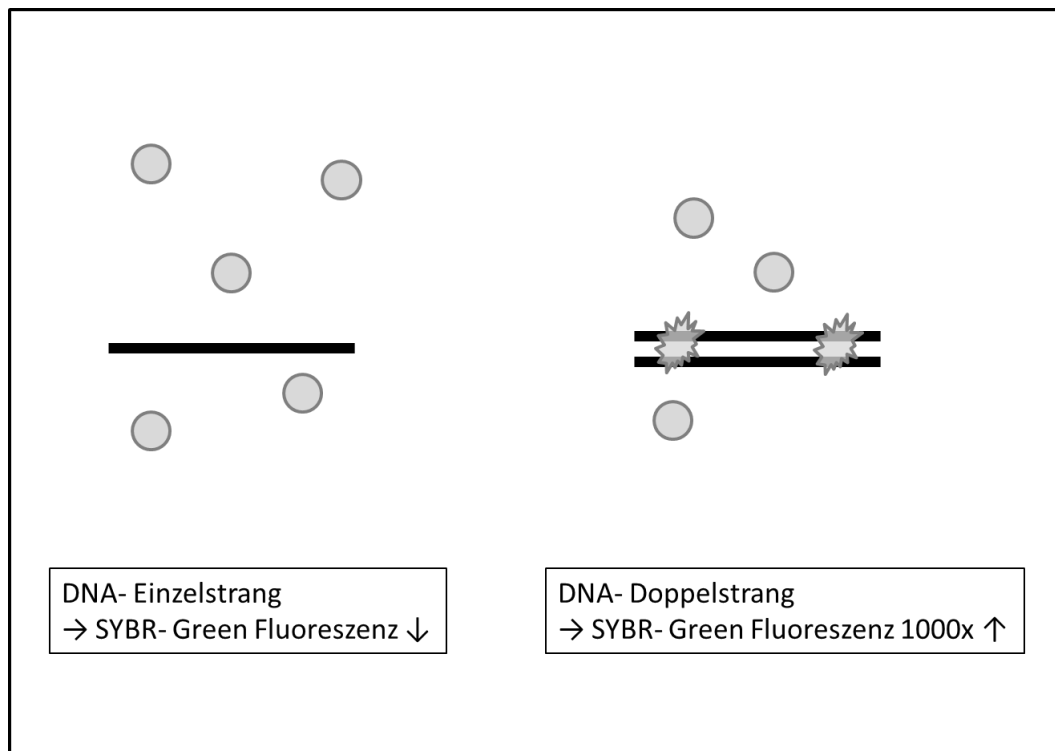


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips von SYBR green: Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und die Fluoreszenz nimmt infolgedessen um ein Vielfaches zu.

4.3.2.2. Versuchsaufbau

Den Tieren wurde am Tag 0 des Versuchs ein Endothelschaden mittels elektrischer Carotisverletzung zugefügt (s. 4.3.1.1.). 48 h nach der Operation wurden die Tiere getötet, sowohl die verletzte als auch die kontralaterale Carotis entnommen und die relative SDF-1 Expression anhand quantitativer Real-Time RT-PCR auf mRNA-Ebene ermittelt, wobei die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen diente.

4.3.2.3. Probengewinnung

Die narkotisierten Tiere (Xylazin/Ketamin) wurden mit CO₂ getötet, nachfolgend wurde die linke *A. carotis communis* freipräpariert und mit einer mikrochirurgischen Schere entnommen, wie bereits unter 4.3.1.3. ausführlich beschrieben.

Zusätzlich wurde bei diesem Versuch die rechte Carotis entnommen, um auf diese Weise sowohl Probe als auch Kontrolle aus demselben Tier zu gewinnen. Die Carotiden wurden entsprechend ihrer Gruppe (verletzt-kontralateral) in ein Zentrifugenröhrchen mit Trizol-Lösung (0,5- 1 ml) überführt und auf Eis gestellt.

Trizol enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat, wodurch eine erste Homogenisierung erfolgt, die RNasen inaktiviert werden und die RNA während der Aufreinigung stabilisiert wird. Es wurden jeweils 2 Tiere pro Probeneinheit zusammengefasst, um genügend Ausgangsmaterial sicherzustellen. Nachfolgend wurden die Proben mittels Ultraschall zerkleinert (2 Zyklen mit 30 Sekunden) und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

4.3.2.4. RNA-Isolierung mit Trizol

Den ultraschallbehandelten Carotiden in Trizol-Lösung wurde Chloroform zugegeben (200 µl/ml Trizol), das Homogenat kräftig durchmischt (15 Sekunden) und bei Raumtemperatur 2-3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (17 900 g, 15 Minuten, 4°C), wodurch 3 Phasen entstehen: eine rötliche untere Phase mit Trizol und Chloroform, eine mittlere Phase, in der sich Proteine befinden und eine wässrige, obere Phase, welche die RNA enthält. Der Überstand wurde folglich in ein neues Röhrchen überführt. Danach wurde Isopropanol hinzugefügt (500 µl/ml), die Probe wieder kräftig durchmischt, bei Raumtemperatur inkubiert (10 Minuten) und im Anschluss zentrifugiert (17 900 g, 10 Minuten, 4°C), was zur Präzipitation der RNA aus der wässrigen Phase führt. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet mit 1 ml EtOH (70%) vorsichtig gewaschen, wobei sich das Sediment nicht komplett lösen sollte. Die Probe wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (8 000 g, 8 Minuten, 4 °C) und der Überstand wiederum verworfen. Das gewonnene Pellet trocknete bei Raumtemperatur (ca. 15 Minuten) und wurde anschließend in RNase-freies Wasser (32 µl) aufgenommen [194, 195].

4.3.2.5. DNase-Verdau

Nach der RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spectrophotometer wurde im Anschluss der DNase-Verdau mit Hilfe des DNase I Amplification Grade kit (Invitrogen) durchgeführt. Hierfür wurden 2 µg RNA eingesetzt und Puffer (4 µl) sowie DNase I (0,5 U) hinzu pipettiert, um letzte genomische DNA-Reste zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde EDTA (4 µl) dazu gegeben. Nach weiteren 10 Minuten bei 65°C wurde die Probe auf Eis gestellt. Zur Überprüfung des DNase-Verdaus wurde jeweils eine Real-time RT-PCR aus DNase verdauter mRNA als Negativkontrolle durchgeführt.

4.3.2.6. cDNA-Synthese

Für die cDNA Umschreibung der RNA wurde der Omniscript RT-kit (Qiagen) verwendet und zunächst die aufgereinigte RNA (2 µg) eingesetzt. Dieser wurden Puffer (2 µl), dNTP (5 mM), Hexamer-Primer-Verdünnung (Random-Primer) (100 ng/µl), Omniscript (4 U/µl) Ribonuclease-Inhibitor (0,5 U/µl) und RNase freies Wasser (8 µl) hinzugefügt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und nachfolgend 5 Minuten lang auf 93 °C erhitzt. Die so erhaltene, einsträngige cDNA wurde mit RNase freiem Wasser auf 20 µl Gesamtmenge aufgefüllt.

4.3.2.7. Quantitative Real-time RT-PCR mit IQ SYBR Green Supermix (BioRAD)

Zu jeder Probe der gewonnenen cDNA (5 µl) wurde jeweils Wasser (7 µl), SYBR Green Super Mix (12,5 µl) und der entsprechende *forward* und *reverse* Primer (je 250 nM) hinzu gegeben, sodass eine Endmenge von 25 µl für die quantitative Real-time RT-PCR genutzt werden konnte. Zur Kontrolle, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen, diente RNase freies Wasser. Als Referenzgen wurde GAPDH eingesetzt.

Name	Primer-Sequenz	Amplikongröße
GAPDH (forward)	5`-TCT TGG GCT ACA CTG AGG AC- 3`	122 bp
GAPDH (reverse)	5`-ACC AGG AAA TGA GCT TGA CA- 3`	
SDF-1α (forward)	5`-GAG CCA ACG TCA AGC ATC TG- 3`	95 bp
SDF-1α (reverse)	5`-CAA TGC ACA CTT GTC TGT TG- 3`	

Tabelle 2: verwendete Primer für die quantitative Real-time RT-PCR; GAPDH dient als Referenzgen; SDF-1 ist das Zielgen.

Die PCR erfolgte nach folgendem Einstellungsprotokoll des Cyclers (My IQ Single Color RT PCR Detection System, BioRad):

Schritt	Zyklen	Zeit	Temperatur	Zweck
1	40	10 sec	95°C	Strangtrennung
		30 sec	56°C	Hybridisierung
		10 sec	72°C	Elongation
2	71	30 sec/1°C	25-95°C	Schmelzkurve

Neben der Amplifikation des erwünschten Produkts, kann es zur unerwünschten Amplifikation von Primerdimeren oder Nebenprodukten kommen. Zur Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten wird im Anschluss an einen PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurde das entstandene PCR-Produkt durch eine stetige Temperaturerhöhung an seinem charakteristischen Schmelzpunkt wieder aufgetrennt, dieser ist bestimmt durch die Anzahl der Basenpaare und den G/C-Gehalt. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme durch das freiwerdende SYBR-green wird detektiert. Jedes PCR-Produkt hat somit einen charakteristischen, vorhersehbaren Schmelzkurvenverlauf, abweichende Kurven lassen den Rückschluss auf Primerdimere oder Nebenprodukte zu. Infolgedessen werden alle Real-time PCR Läufe ausgeschlossen, die in der Schmelzkurvenanalyse ein anderes oder zusätzliches Temperaturmaximum aufweisen als jenes des erwünschten Produkts.

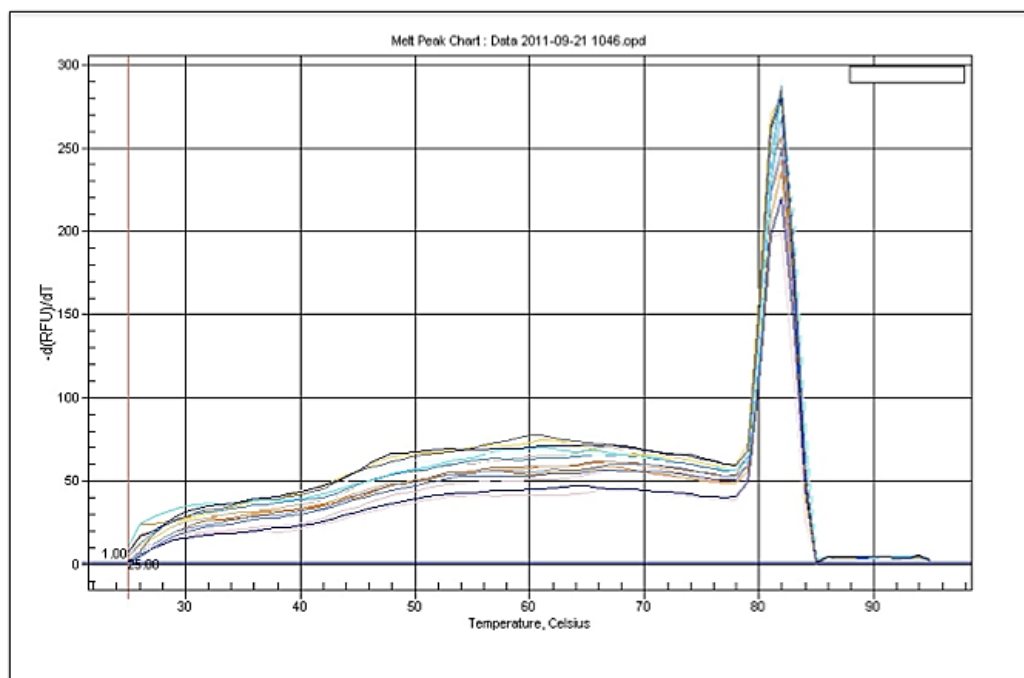


Abbildung 14: Schmelzkurve des SDF-1α. Hier ist das charakteristische

Maximum des SDF-1 α bei 83°C erkennbar, folglich wurde bei diesem PCR-Lauf nur das erwünschte Produkt amplifiziert.

4.3.2.8. Auswertung mittels delta-delta-C_T-Methode

Die abschließende Quantifizierung der PCR geschieht auf Grundlage der PCR-Kinetik und nicht anhand der absoluten Menge an PCR-Produkt. Hierzu muss der sogenannten *Threshold-Cycle* oder C_T-Wert bestimmt werden. Dieser definiert sich als der Zyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet.

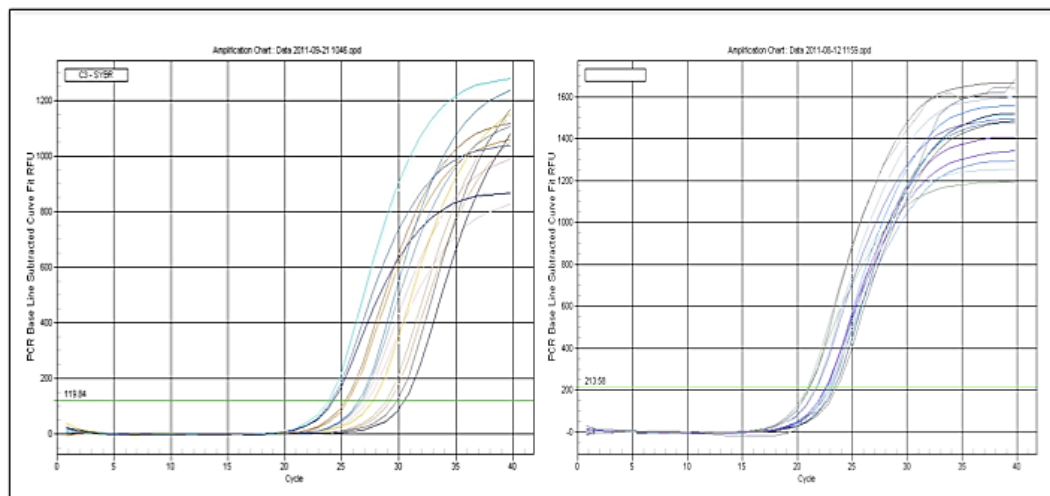


Abbildung 15: links: SDF-1 α ; rechts: GAPDH, als waagrechte grüne Linie ist der Fluoreszenz- Schwellenwert (Threshold) markiert.

Die Berechnung erfolgte sodann über die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Livak [196]. Hierfür wird neben der relativen Expression einer Zielsequenz, in diesem Fall des SDF-1 α , die relative Expression eines Referenzgens, das sogenannte *housekeeping gene*, bestimmt. Dieses definiert sich idealerweise über eine relativ stabile Expressionsrate in allen Zelltypen, welche unabhängig von äußeren Einflüssen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde GAPDH verwendet. Im ersten Schritt erfolgt eine Normierung, indem die Expression des Zielgens auf das konstant exprimierte Referenzgen bezogen wird. Anschließend wird aus dem so erhaltenen ΔC_T -Werten beider Gruppen (verletzt-kontralateral) der $\Delta\Delta C_T$ -Wert gebildet. Nachfolgend setzt man den Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ein, dadurch erhält man schließlich ein Vielfaches der behandelten Probe verglichen mit der Kontrolle.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen (SDF-1)} - C_T \text{ Referenzgen (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe (verletzt)} - \Delta C_T \text{ Kontrolle (kontralateral)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \text{-Wert}$$

Somit war es möglich, eine Aussage über den relativen Expressionsunterschied von SDF-1 in der deendothelialisierten Carotis verglichen mit der unverletzten Seite zu treffen, normalisiert zum Referenzgen.

4.3.3. FACS-Analyse

4.3.3.1. Prinzip der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie mittels eines „fluorescent activated cell sorters“ (FACS) stellt ein automatisiertes Verfahren der Zellanalyse dar, das erlaubt eine Klassifizierung von Zellen anhand gebundener Fluoreszenzfarbstoffe und darüber hinaus eine Bestimmung der Größe und Granularität, bedingt durch das Streulicht, vorzunehmen. Die zu messenden Zellen in Suspension werden aus einem Probenröhrchen gesaugt und gelangen mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare, wobei durch die Trägerflüssigkeit in der umgebenden Küvette ein laminarer Hüllstrom erzeugt wird. Bei Erreichen der Messzelle des Geräts werden die Zellen stark beschleunigt (hydrodynamische Fokussierung), sodass sie perlschnurartig aneinandergereiht, einzeln einen Argon-Ionen-Laser erreichen, der folglich direkt oder indirekt aufgebrachte Fluorochrome bei einer bestimmten Wellenlänge, in diesem Fall 488 nm, anregt. Schließlich wird die entstehende Fluoreszenz von jeder Zelle separat detektiert. Weiter kann die Zellgröße einerseits anhand des Vorwärtstreulichts (FSC = Forwardscatter) und die Granularität der Zellen andererseits mittels Seitwärtstreulicht (Sidesscatter = SSC) bestimmt werden. Anhand der Zellgröße, der Granularität und schließlich der Anregbarkeit durch den Laser wird dann eine Zellcharakterisierung und –quantifizierung ermöglicht.

4.3.3.2. Versuchsaufbau: FACS-Analyse

In diesem Versuch sollte das Homing CXCR4-positiver Zellen an einem Endotheldefekt quantifiziert werden. Hierzu wurde eine Sitagliptin-behandelte Gruppe mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Zunächst wurden Knochenmarks-Stammzellen aus Spendermäusen gewonnen, aufgereinigt und durch Inkubation mit DiI farblich markiert. Diese Zellen wurden im Anschluss an die Carotid injury-OP Empfänger-mäusen (10^6 vitale Zellen pro Maus) über die

Schwanzvene transplantiert. 24 Stunden später wurden die Carotiden entnommen, das Gewebe mittels Lyse vereinzelt und mit einem CXCR4-Antikörper gefärbt. Mittels FACS-Analyse wurde dann die Anzahl der Zellen bestimmt, die sowohl positiv für DiI als auch für CXCR4 waren, bezogen auf die Gesamtzellzahl der Probe.

4.3.3.2.1. Gewinnung, Aufreinigung und Färbung der Stammzellen mit DiI aus dem Knochenmark von Spendermäusen

Die narkotisierten Spendermäuse (Ketamin/Xylazin) wurden mit CO₂ schmerzlos getötet und anschließend wurde zunächst die Haut von den Hintergliedmaßen entfernt. Nachfolgend wurde die erste, enthäutete Hintergliedmaße am Hüftgelenk (*articulatio coxae*) mit einem Scherenschlag abgesetzt. Die Muskeln an Femur und Tibia wurden abpräpariert, die Fibula entfernt und die beiden Röhrenknochen durch ein stumpfes Durchtrennen des Knie- und Sprunggelenks vereinzelt. Die Knochen wurden anschließend in eine Petrischale mit PBS (9,6 g/l Aqua dest.) überführt. Dasselbe Procedere wurde an der kontralateralen Gliedmaße und an den oberen Extremitäten analog wiederholt.

Sobald alle Knochen isoliert waren, wurden sie kurz in EtOH (70%) oberflächlich desinfiziert und anschließend unter der Sterilwerkbank in PBS überführt. Die Condylen wurden beidseits mit einer Schere entfernt und der verbliebene Knochen mit DMEM+FCS (fetales Kälberserum) (10%), das im Vorab in einer Spritze (2 ml) mit Kanüle (30G) aufgezogen worden war, durchgespült. Das gewonnene Knochenmark aller Knochen wurde anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und durch ein Zellsieb (70 µm) in ein Röhrchen (50 ml) überführt, das anschließend mit PBS auf 45 ml aufgefüllt wurde. Die Suspension wurde für 10 Minuten zentrifugiert (300 g), der Überstand verworfen und das so erhaltene Pellet in einem Lysepuffer (s.u.) resuspendiert und mit diesem für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zusammensetzung des Lysepuffers:

0,37 g EDTA Dinatriumsalz

8,02 g Ammoniumchlorid

0,84 g Natriumbicarbonat

Mit destilliertem H₂O auf 100 ml auffüllen

Im nächsten Schritt wurde die Suspension erneut auf 45 ml mit PBS aufgefüllt

und zentrifugiert.

Für die Färbung mit DiI wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Optimem-Medium (1 ml) resuspendiert. Der DiI-Farbstoff (5 µl/ml) wurde der Suspension hinzugefügt, durch Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz gut durchmischt und schließlich für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde wiederum zentrifugiert (300 g), der Überstand vorsichtig abgekippt und das so erhaltene Pellet in PBS aufgenommen.

Im letzten Schritt wurde die Anzahl der gefärbten Zellen mittels einer Zählkammer bestimmt und in Portionen zu je 1×10^6 Zellen aufgeteilt.

4.3.3.2.2. Carotid injury und Transplantation der DiI-gefärbten Stammzellen

Das Homing der Stammzellen sollte an einer Kontrollgruppe einerseits und einer Sitagliptin-behandelte Gruppe andererseits untersucht werden. Um einen ausreichend hohen Wirkstoffspiegel des Sitagliptins bei Transplantation der Stammzellen sicherzustellen, wurde der betreffenden Gruppe bereits einen Tag vor Induktion des Carotisschadens das entsprechende Arzneifuttermittel verabreicht. Im nächsten Schritt wurde bei beiden Gruppen die Deendothelialisierung der Carotis wie unter 4.3.1.1. beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde bei den noch in Narkose befindlichen Tieren die Schwanzvene punktiert (Kanüle, 30G) und langsam die vorbereitete Zellsuspension (1×10^6 Zellen) (s. 4.3.3.2.1.) injiziert. Die Sitagliptin-Behandlung wurde bis zur Probengewinnung fortgesetzt (s. Abbildung 16).

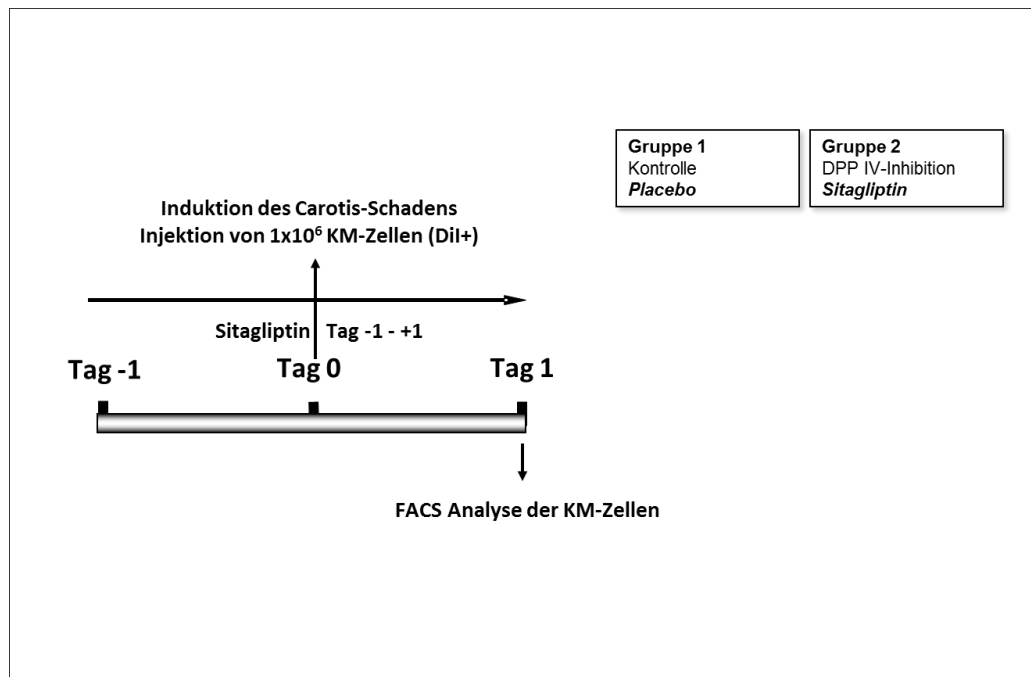


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

4.3.3.2.3. Probengewinnung, Weiterverarbeitung, Färbung mit dem CXCR4-Antikörper und FACS-Analyse

Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach Carotis-OP zunächst narkotisiert (Ketamin/Xylazin) und anschließend mit CO₂ schmerzlos getötet. Es wurde sowohl die verletzte als auch die unverletzte Carotis eines Versuchstiers wie unter 3.3.1.3. ausführlich beschrieben entnommen, um so zusätzlich zu den unterschiedlichen Gruppen (Kontrolle vs. Sitagliptin) interne Vergleichsdaten zu erhalten. Die Carotiden wurden bis zur weiteren Verarbeitung entsprechend in einem Eppendorf-Cup mit DMEM+FCS (10%) (1 ml) gesammelt. Es wurden jeweils 2 Tiere derselben Gruppe pro Probeneinheit zusammengefasst, um eine ausreichend große Ausgangsmenge für die anschließende FACS-Analyse zu gewährleisten.

Im nächsten Schritt wurden die Carotiden mit einer mikrochirurgischen Schere zerkleinert, die Probe gut durchmischt und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (300 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Pellet mit in DMEM verdünnter Collagenase (Worthington Typ I; 0,2 mg/100 ml, 200 µl) resuspendiert und bei 37°C für 45 Minuten verdaut, wobei durch ein zeitweises Auf- und Abpipettieren die Lyse unterstützt wurde.

Nach Abschluss des Verdaus wurde dem Lysat 1 ml DMEM+FCS (10%)

hinzugefügt, die Probe durchmischt und anschließend durch ein Zellsieb (70 µm) pipettiert. Das aufgefangene Filtrat wurde 10 Minuten (300 g) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die CXCR4-Antikörper-Lösung dazu gegeben. Die Probe wurde gut durchmischt und bei 4 °C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert.

Abschließend wurde die Probe mit PBS auf 1-2 ml aufgefüllt, gut durchmischt und erneut für 10 Minuten zentrifugiert (300 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Pellet mit PBS verdünnt und die Probe mittels FACS analysiert.

Als Kontrolle dienten isolierte und entsprechend behandelte Stammzellen (DiI⁺, CXCR4-Ak) aus Spendermäusen und als Negativkontrolle die Carotiden einer Maus ohne vorangegangener Carotisverletzung und Zelltransplantation.

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer Becton Dickinson FACSCalibur.

4.3.4. Reendothelialisierungs-Assay

4.3.4.1. Versuchsaufbau: Reendothelialisierungs-Assay

Den Mäusen wurde für das Reendothelialisierungs-Assay ein Endothelschaden am Tag 0 mittels Carotid injury zugefügt. Die Tiere wurden entsprechend des Versuchsprotokolls von Tag 0-3 behandelt (s. Abbildung 17).

Hierfür wurden 5 Gruppen generiert: Eine Placebo-Kontrollgruppe, eine weitere Gruppe, der G-CSF in Monotherapie verabreicht wurde, eine Gruppe, der ein DPP IV-Inhibitor in Monotherapie verabreicht wurde und eine Gruppe, die eine Kombinationstherapie aus G-CSF und DPP IV-Inhibitor erhielt. Abrundend wurde eine letzte Gruppe mit DPP IV-Inhibitor und AMD 3100 behandelt, um über eine Unterbrechung der SDF-1α/CXCR4-Achse das zugrundeliegende Prinzip zu überprüfen und mögliche weitere Mechanismen der DPP IV-Inhibitoren zu identifizieren.

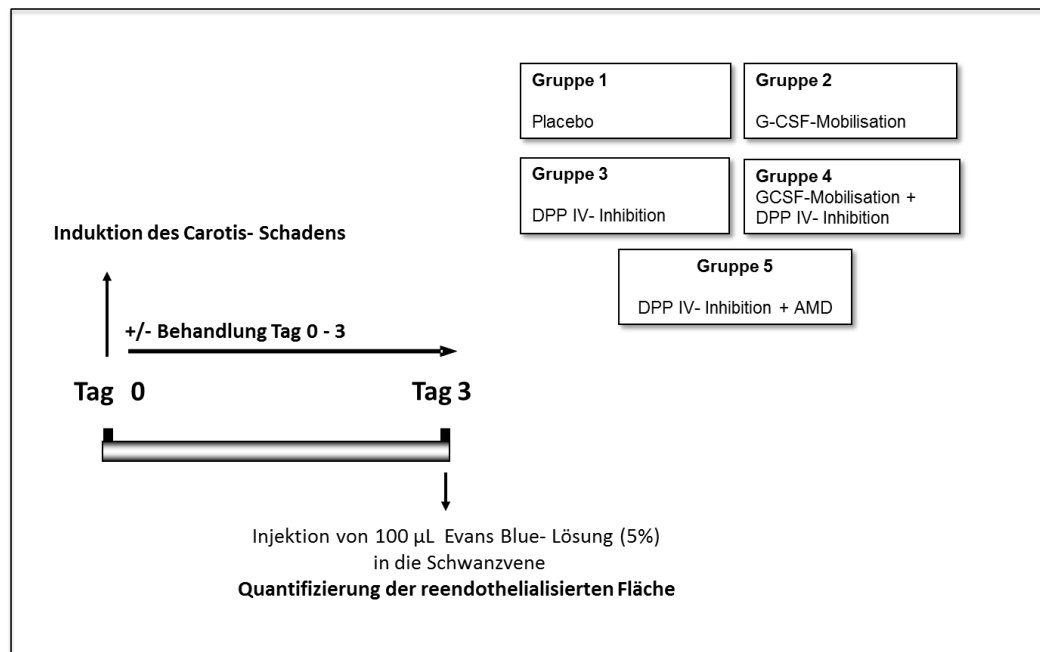


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Der gesamte Versuchsaufbau wurde zunächst mit Sitagliptin als DPP IV-Inhibitor durchgeführt und nachfolgend mit Vildagliptin entsprechend verifiziert.

Im Anschluss an die Therapie wurde an Tag 3 mit Hilfe der Evans Blue-Färbung der vorhandene Endothelschaden quantifiziert bzw. die reendothelialisierte Fläche ermittelt.

4.3.5. Durchführung des Reendothelialisierungs-Assays

Zur Quantifizierung der reendothelialisierten Fläche mittels Evans Blue-Färbung (Reendothelialisierungs-Assay) wurden die Tiere erneut gewichtsabhängig mit Ketamin/Xylazin i.p. narkotisiert. Sobald die Mäuse die angemessene Narkosetiefe erreicht hatten, wurden sie einzeln aus ihrem Käfig entnommen und die Schwanzvene unter Zuhilfenahme von warmem Wasser und externer Alkoholapplikation dilatiert. Anschließend wurde die Schwanzvene mittels Kanüle (30 G) punktiert und 100 µl einer Evans Blue-Lösung (5%) in die Schwanzvene injiziert. Diese Lösung zirkulierte 3-5 Minuten im Kreislauf, infolgedessen nahm der gesamte Tierkörper eine Blaufärbung an, anschließend wurde die narkotisierte Maus durch CO₂ schmerzlos getötet.

Im Anschluss wurde die Maus auf dem Rücken liegend an den Gliedmaßen mit Klebestreifen fixiert und der Oberkiefer mit einem Gummiband in Lage gebracht, um die Gefäße durchzuspülen und die Carotis zur weiteren Analyse zu

entnehmen. Hierzu wurde in der Medianen des oberen Quadranten des Bauchs mit einem Schnitt bis zum Sternum Haut, Muskulatur und Peritoneum durchtrennt und die Leber tief eingeschnitten. In einem nächsten Schritt wurde über Eröffnen des Zwerchfells ein Zugang in den Brustraum und somit zum Herz geschaffen. Die Rippen wurden beidseits lateral durchtrennt und das Sternum wurde schließlich cranial abgesetzt. Nun wurden mit Hilfe einer 50 ml Infusionsspritze 30-50 ml NaCl-Lösung (0,9%) in den linken Ventrikel gespritzt, um antegrad das Blut/Evans Blue-Gemisch aus der Carotis und dem übrigen Kreislaufsystem heraus zu spülen. Die Drainage der Spülflüssigkeit erfolgte über den Lebereinschnitt.

Die linke Carotis wurde nachfolgend, wie bereits unter 4.3.1.3. ausführlich beschrieben, entnommen.

Das Gefäß wurde im Anschluss vorsichtig mit NaCl gespült, auf einen Objektträger aufgebracht, mit Vitro Clud fixiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Reendothelialisierung wurde unter dem Mikroskop abschließend quantifiziert, indem die dunkelblaue, deendothelialisierte Fläche in mm^2 ausgemessen wurde, welche sich deutlich von der endothelbedeckten, hellen Fläche abhob.

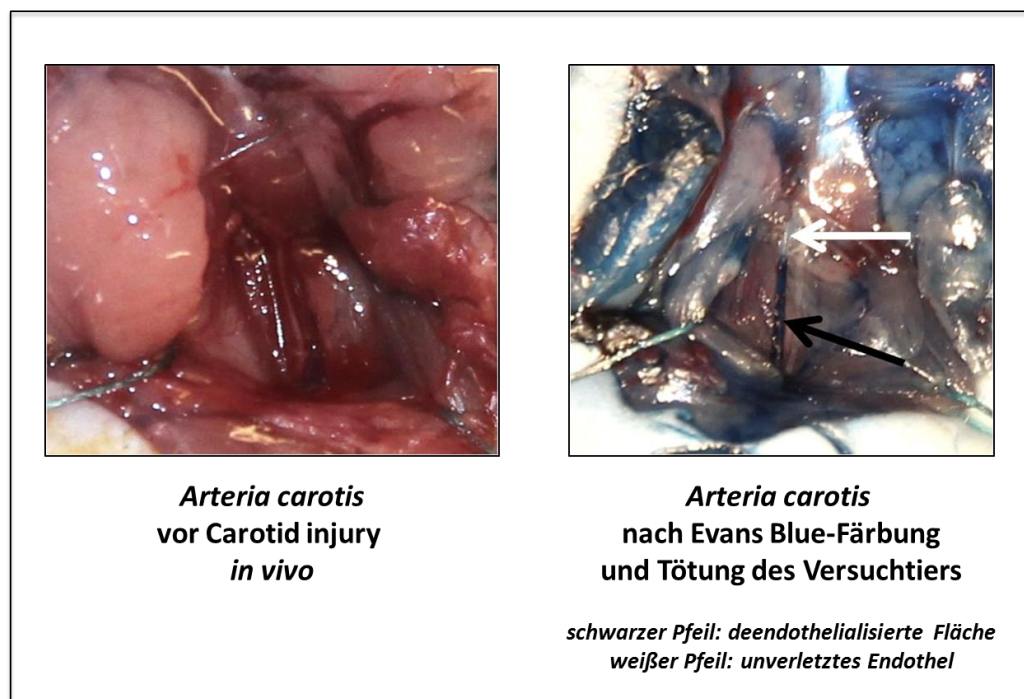


Abbildung 18: Arteria carotis vor und nach Carotid injury-OP mit anschließender Evans Blue-Färbung

4.3.6. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, bei dem aus einer organischen oder anorganischen Probe Ionen erzeugt, nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis m/z getrennt und detektiert werden können [197].

In der massenspektrometrischen Analyse ist es möglich zwischen dem ungespaltenen SDF-1 α (68 Aminosäuren) und dessen gespaltenen, inaktivierter Erscheinungsform (66 Aminosäuren) zu unterscheiden. Hierbei lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Molekül-Masse auf die Proteinelänge und somit auf die jeweilige Form des SDF-1 α rückschließen, wie in der nachfolgenden Abbildung aufgezeigt:

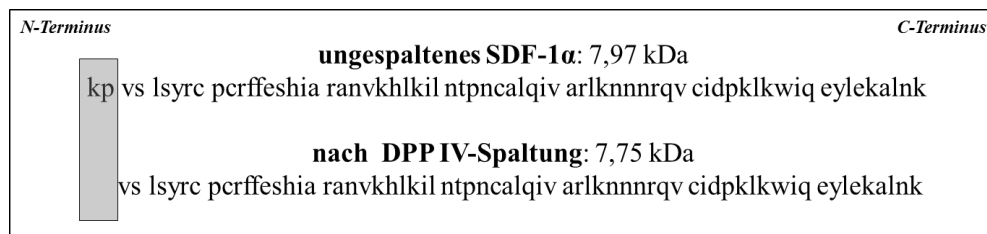


Abbildung 19: Das ungespaltene SDF-1 α (68 AS) hat eine theoretische Masse von 7,98 kDa. Das durch die DPP IV verursachte Spaltprodukt (66 AS) hingegen liegt theoretisch bei 7,75 kDa (modifiziert nach [23]).

4.3.6.1. Versuchsaufbau

Bei allen Tieren wurde an Tag 0 ein Endothelschaden mittels Carotid injury induziert. Anschließend erfolgte in beiden Behandlungsgruppen eine medikamentöse Inhibition der DPP IV bis zur Tötung der Tiere an Tag 3. Eine Versuchstiergruppe erhielt zu diesem Zweck den Wirkstoff Sitagliptin, die andere Gruppe Vildagliptin, wobei bei letzterer nur das Serum untersucht wurde. Als Vergleich diente eine unbehandelte Kontrollgruppe (s. Abbildung 20).

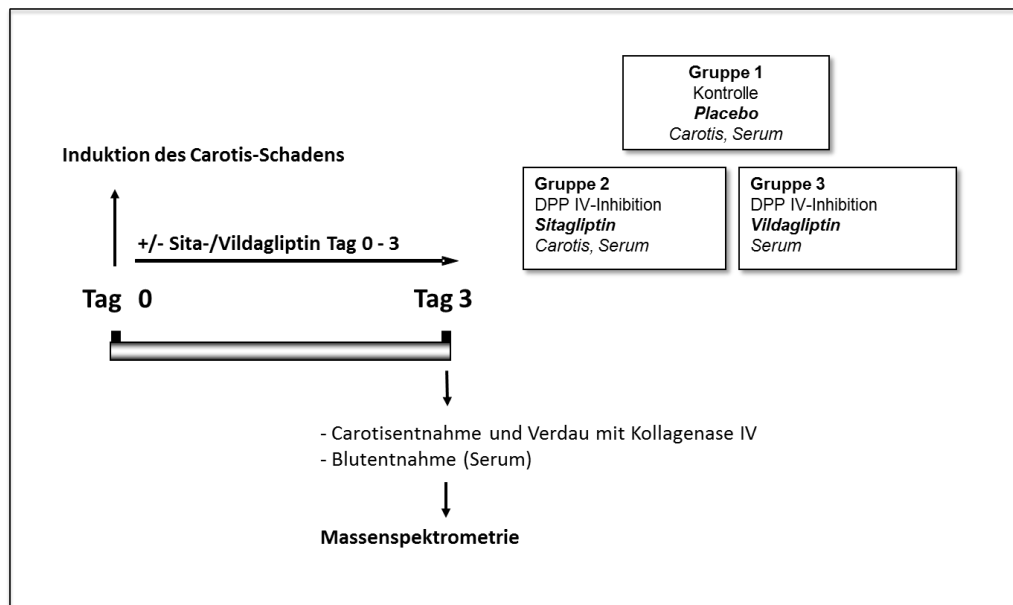


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

4.3.6.2. Probengewinnung und Weiterverarbeitung

Von den operierten Tieren wurden an Tag 3 Blut und Carotidgewebe zur weiteren Analyse entnommen. Es wurden 5 Tiere pro Probeneinheit zusammengefasst, um genügend Material für die weitere Analyse sicherzustellen.

Zunächst wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert und in Rückenlage an den Gliedmaßen mit Klebestreifen sowie an den oberen Inzisivien mit einem Gummiband fixiert. Daraufhin wurde der Bauchraum mit einem Scherenschlag eröffnet und über das Zwerchfell ein Zugang zum Thorax geschaffen. Die Rippen wurden jeweils lateral durchtrennt, das Sternum angehoben und kranial abgesetzt. Nun wurde mit einer Spritze aus dem rechten Ventrikel bis zu 1 ml Blut gewonnen und in ein EDTA-Röhrchen (1,6 mg EDTA/ml Blut) auf Eis überführt. Sobald die Blutproben im EDTA-Röhrchen gesammelt waren, wurde dieses bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde die gelbliche Serumphase mit einer Pipette abgenommen, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt.

An der toten Maus wurde die linke *A. carotis communis* freipräpariert und mit Hilfe einer mikrochirurgischen Schere großzügig abgesetzt. Nachfolgend wurde das Gewebe in einer 24-well Platte mit Kollagenase (Worthington Typ IV, [0,1 mg/100 ml], 500 µl) verdaut. Um die Lyse zu unterstützen, wurde die Platte in einen Inkubator bei 37 °C gestellt und die Zellsuspension alle 10 Minuten auf- und abpipettiert. Nach 40 Minuten war der Verdau abgeschlossen. Das Lysat

konnte durch ein Zellsieb (70 μm) pipettiert und das gewonnene Filtrat anschließend auf Eis gestellt werden.

Die Serumphase und das verdaute Gewebe wurden zur Massenspektrometrie an unseren Kooperationspartner Dr. Lars Israel, in das Zentrum für Proteinanalytik der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter der Leitung von Prof. A. Imhof, weitergereicht.

Dort wurden 100 μl je Probe für 1,5 Stunden bei 56 °C inkubiert, was zu einer Trübung bzw. zum Ausfall der Lösung führte und anschließend mit einer Tischzentrifuge für 30 Sekunden zentrifugiert. 20 μl des Überstands wurden danach mit 20 μl PBS und 5 μl rekombinantem SDF-1 α (100 ng/1 μl) angesetzt und über Nacht bei 37 °C und einer Rotation von 46 g inkubiert. Am nächsten Tag wurde anti-SDF-1 α -Antikörper (5 μl) und Protein-G-Sepharose (10 μl) hinzugefügt und der Ansatz für 5-6 h im Kühlraum inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe jeweils dreimal mit 1X IP-Puffer (50 μl) und dreimal mit HPLC-Wasser (50 μl) gewaschen und der Überstand weitestgehend abgenommen. Die so gewonnenen Beads wurden über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Am folgenden Tag wurde den Beads 10 μl einer CHCA-Matrix (Endkonzentration: 50% ACN/ 0,3% TFA) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren die Probe sorgfältig durchmischt. Der Überstand (3-4 μl) wurde anschließend auf ein hydrophobes Target gespottet und in einem Voyager-STR-Maldi-Tof Massenspektrometer gemessen. Für die Spektren wurden insgesamt bis zu 1000 Laser-Shots in einem Massenbereich von m/z-Werte zwischen 1000 und 10 000 gesammelt [23].

4.3.7. Statistische Auswertung

Die Auswertung aller Daten erfolgte mittels Student's t-Test. Als signifikant wurde ein p-Wert < 0,05, als hochsignifikant ein p-Wert < 0,01 angenommen und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet [23].

V. ERGEBNISSE

5.1. EXPRESSION VON SDF-1 ALPHA NACH CAROTID INJURY

Basierend auf dem von uns postulierten Mechanismus zum Homing von epithelialen Progenitorzellen (vgl. Einleitung) erfolgte in einem ersten Schritt der Nachweis einer verstärkten Expression des Homing-Faktors SDF-1 α in der Gefäßwand nach elektrischer Deendothelialisierung der Carotis.

Hierzu wurde jeweils die linke *A. carotis communis* der Versuchstiere mittels Carotid injury Methode deendothelialisiert (vgl. 4.3.1.1.) und das jeweilige kontralaterale Gefäß als Kontrolle genutzt.

Nach entsprechender Aufbereitung der Proben wurde über quantitative Real-time RT-PCR die Expression des SDF-1 α auf mRNA-Ebene im Carotidgeewebe ermittelt (vgl. 4.3.2.3-4.3.2.7.).

Hierzu wurden spezifische Primer-Paare generiert und nach dem vorliegenden RT-PCR-Protokoll verwendet (vgl. 4.3.2.7.).

48 Stunden nach erfolgter Carotis-Verletzung ließ sich in den deendothelialisierten Carotiden im Vergleich zur unverletzten, kontralateralen Carotis ein signifikanter Anstieg der SDF-1 α -Expression um den Faktor 2,01 nachweisen (s. Abbildung 21).

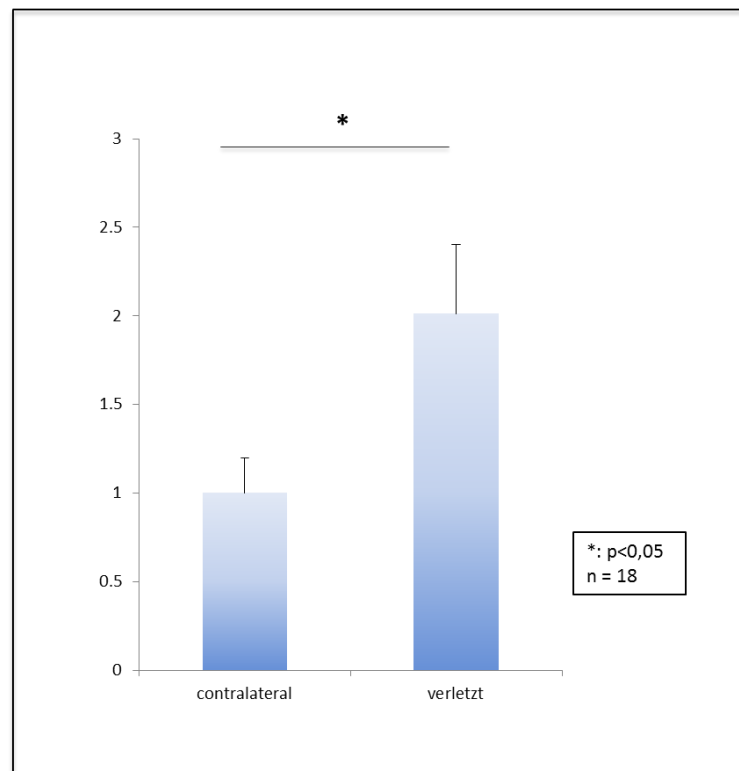


Abbildung 21: Relative SDF-1α Expression nach elektrischer Deendothelialisierung auf mRNA-Ebene im Vergleich zum kontralateralen Kontroll-Gefäß, 48 h nach Carotid injury-OP.

5.2. HOMING CXCR4⁺-STAMMZELLEN IM CAROTID-INJURY-MODELL

Im Folgenden sollte der Einfluss der Sitagliptin-Therapie auf das Homing von CXCR4⁺-Stammzellen aus dem Knochenmark untersucht werden. Hierzu wurden aus Spendermäusen Knochenmarks-Stammzellen isoliert, diese mit DiI gefärbt und im Anschluss an die Carotid injury-OP in Empfänger-mäuse über die Schwanzvene transplantiert (vgl. 4.3.3.2.1.-4.3.3.2.2.). Nach 24 Stunden wurden die Carotiden beidseits entnommen, lysiert und über mehrere Zentrifugationsschritte aufgereinigt, um die CXCR4⁺ Zellen schließlich mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper im FACS dedektieren zu können (vgl. 4.3.3.2.3.).

Es zeigte sich zunächst ein signifikant gesteigertes Vorkommen der CXCR4⁺ DiI⁺ Zellen am verletzten Gefäß gegenüber der unverletzten Seite, sowohl was die Kontrollgruppe betraf als auch jene unter Sitagliptin-Therapie. Ein deutlicher

Effekt zeigte sich ebenfalls beim Vergleich der verletzten Seite der Gruppen miteinander: Die Versuchstiere unter Sitagliptin-Therapie wiesen eine signifikante Erhöhung des Anteils von CXCR4⁺DiI⁺ Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der Carotis auf (s. Abbildung 22 und 23).

Folglich bedingt die Deendothelialisierung eines Gefäßes ein gesteigertes Homing von CXCR4⁺ Progenitorzellen im geschädigten Areal. Darüber hinaus lässt sich mittels DPP IV-Inhibition durch pharmakologische Sitagliptin-Therapie dieser Effekt signifikant erhöhen.

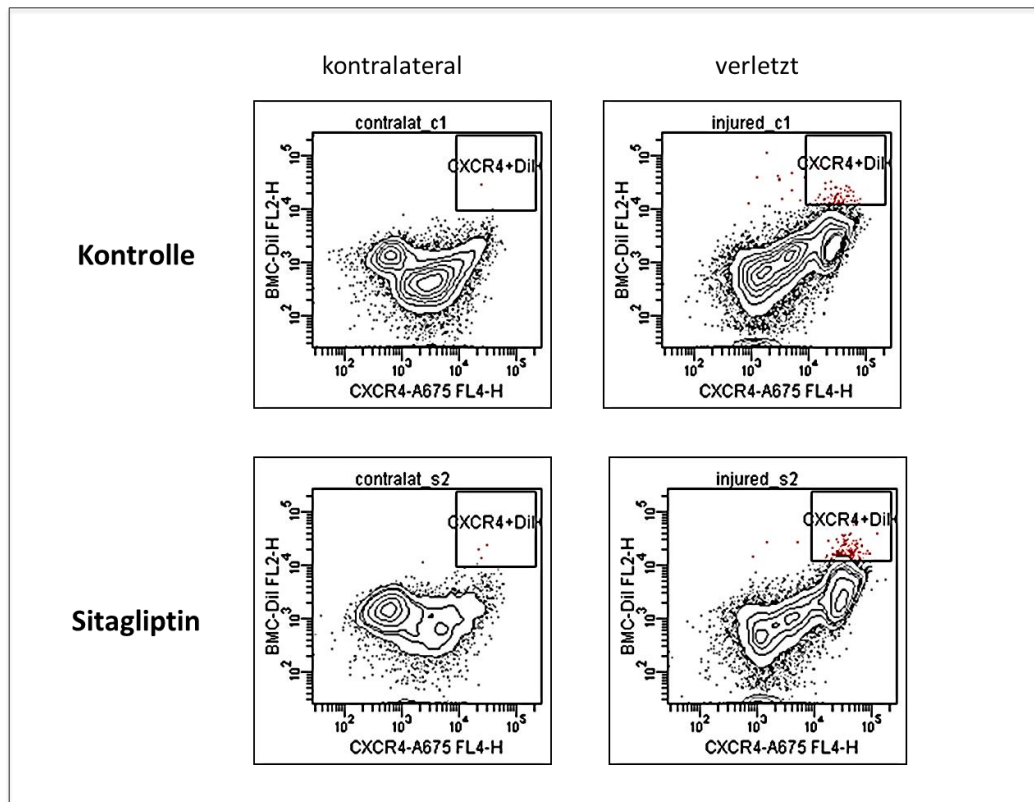


Abbildung 22: Das Homing der CXCR4⁺-Zellen, dargestellt mit dem FACS-Analyse-Programm. Auf der Abszisse sind die CXCR4⁺ Zellen aufgetragen, auf der Ordinate die DiI⁺. Die doppelt positiven Zellen sind jeweils rot hervorgehoben. In den oberen beiden Abbildungen wird deutlich, dass die Verletzung der Carotis zu einem verstärkten Homing von Progenitorzellen aus dem Knochenmark führt. In den rechten beiden Abbildungen ist ersichtlich, dass durch Inhibition der DPP IV (Sitagliptin) das Homing von zirkulierenden CXCR4⁺ Zellen noch gesteigert werden kann.

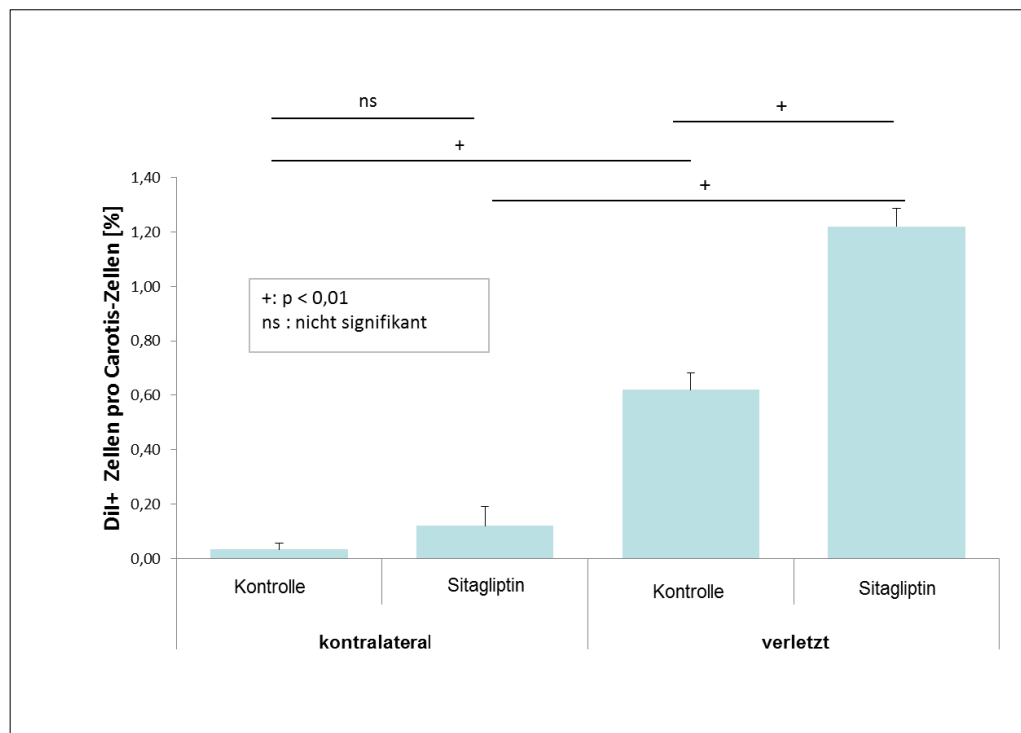


Abbildung 23: Quantifizierung der eingewanderten DiI^+CXCR4^+ Zellen in Abhängigkeit von Gefäßschädigung (kontralateral – verletzt) und Therapie (Kontrolle – Sitagliptin). Die eingewanderten $CXCR4^+$ Zellen werden jeweils bezogen auf die Gesamtzellzahl der Carotis, 1 Tag nach Carotid-injury, Angaben in Prozent.

5.3. INHIBITION DER DPP IV UNTER ORALER GLIPTIN-THERAPIE IM CAROTID-INJURY-MODELL DER MAUS – NACHWEIS MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE

Die Dipeptidylpeptidase IV inaktiviert SDF-1 α durch N-terminale Abspaltung eines Dipeptids. Folglich war es von hohem Interesse zu untersuchen, ob eine Inhibition dieses Enzyms zu einer Stabilisation der ungespaltenen, aktiven Form des SDF-1 α führt. Dazu wurde sowohl das Blut als auch das verletzte Carotidgewebe der Tiere 3 Tage nach Zufügen des Endotheldefekts massenspektrometrisch analysiert. Die DPP IV-Inhibition erfolgte hierbei mit Sitagliptin. Im Serum wurde zusätzlich der Effekt des Vildagliptins untersucht. Die Therapiegruppen wurden mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen (vgl. 4.3.5.).

5.3.1. DPP IV-Aktivität im Blut

Für die massenspektrometrische Untersuchung des Bluts wurde das Serum der einzelnen Versuchsgruppen mit rekombinantem SDF-1 α inkubiert.

Die unbehandelten Tiere zeigten einen Peak bei 7,97 kDa, der das ungespaltene SDF-1 α (68 Aminosäuren) abbildet und einen weiteren bei 7,75 kDa, der dem inaktivierten Spaltprodukt (66 Aminosäuren) entspricht. Bei den Gliptin-behandelten Gruppen ließ sich der Peak des inaktiven, gespaltenen SDF-1 α bei 7,75 kDa nicht mehr nachvollziehen. Diese Gruppen hingegen wiesen lediglich einen Peak bei 7,98 kDa auf, welcher mit dem ungespaltenen Protein übereinstimmt (vgl. Abbildung 24+25).

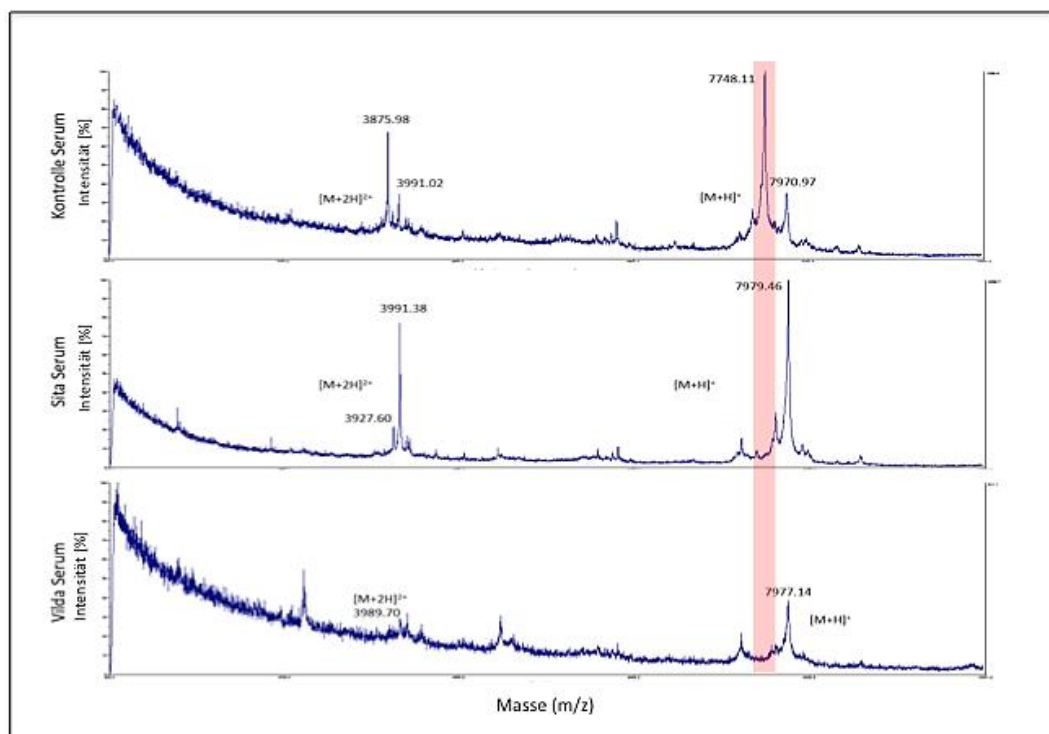


Abbildung 24: Massenspektrometrische Untersuchung der DPP IV-Aktivität im Serum von Kontrolltieren (oben), Sitagliptin (Mitte)- und Vildagliptin (unten)-behandelten Tieren.

Innerhalb des rot markierten Bereichs: Das durch die DPP IV generierte Spaltprodukt des SDF-1 α (bei 7,75 kDa), dieses ist bei der Kontrolle (oben) deutlich erkennbar, fehlt hingegen bei den Gliptin-behandelten Gruppen (Mitte und unten).

5.3.2. DPP IV-Aktivität im Carotisgewebe

Das Carotisgewebe wurde ebenfalls nach entsprechender Aufbereitung mit dem

rekombinanten SDF-1 α inkubiert.

In beiden Gruppen zeigte sich ein Peak bei 7,98 kDa, der das ungespaltene SDF-1 α abbildet. Die Kontrolltiere wiesen zusätzlich einen Peak bei 7,77 kDa auf, der das Spaltprodukt der DPP IV repräsentiert und bei den Sitagliptin-behandelten Tieren nicht mehr nachweisbar ist. Zusätzlich tauchte bei beiden Versuchsgruppen ein weiterer Peak bei ca. 7,58 kDa auf (vgl. Abbildung 26). Die Abspaltung von 4 Aminosäuren am N-terminalen Ende ist typisch für die Enzymklasse der Matrixmetalloproteinasen (vgl. Abbildung 25).

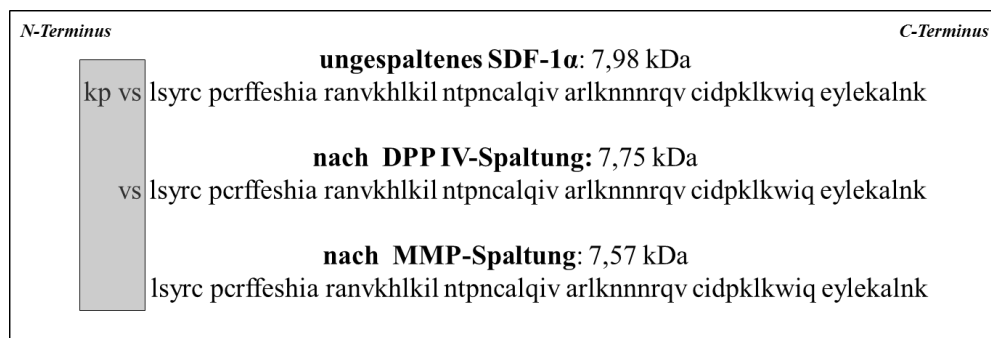


Abbildung 25: Ungespaltene SDF-1 α (68 AS) hat eine theoretische Masse von 7,98 kDa. Die DPP IV-bedingte Abspaltung von 2 Aminosäuren führt zu einer theoretischen Masse von 7,75 kDa. Das durch MMPs verursachte Spaltprodukt (64 AS) hingegen liegt theoretisch bei 7,57 kDa (modifiziert nach[23]).

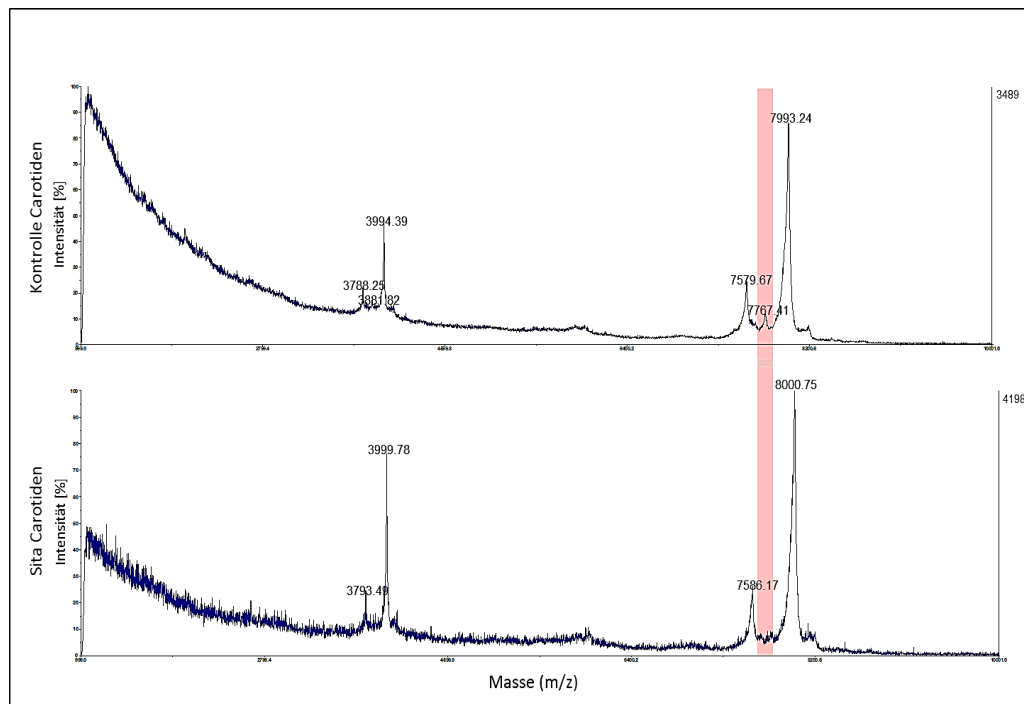


Abbildung 26: Massenspektrometrische Untersuchung der DPP IV- Aktivität im Carotidgewebe von Kontrolltieren (oben) und Sitagliptin-behandelten Tieren (unten).

Innerhalb des rot markierten Bereichs: Das durch die DPP IV generierte Spaltprodukt des SDF-1 α (bei 7,77 kDa), dieses ist bei der Kontrolle (oben) erkennbar, fehlt hingegen bei der Sitagliptin-behandelten Gruppe (unten).

Ein zusätzliches Spaltprodukt des SDF-1 α (bei ca. 7,58 kDa) ist sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Sitagliptin-behandelten Gruppe sichtbar, verursacht durch MMP-Aktivität.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse, dass die aktive Form des SDF-1 α durch Inhibition der DPP IV sowohl im Serum als auch im Carotidgewebe stabilisiert wird. Im Carotidgewebe sind an Tag 3 zusätzlich Matrixmetalloproteinasen aktiv, die von der Gliptinbehandlung unbeeinflusst bleiben und SDF-1 α durch Abspaltung von 4 Aminosäuren teilweise inaktivieren.

5.4. REENDOTHELIALISIERUNG

5.4.1. Etablierung des Reendothelialisierungs-Assays im Labor

Um die Effekte einzelner Therapieansätze *in vivo* analysieren zu können,

etablierten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ulf Landmesser, Zürich, Schweiz, das elektrische Carotid-injury-Modell als eine leicht durchführbare und gut zu reproduzierende Methode (vgl. 4.3.1.). Ein weiterer Vorteil der Methode lag ferner in der geringen prozeduralen Belastung der Versuchstiere.

In einem ersten Schritt wurde für die folgenden Therapieversuche ein Reendothelialisierungsstandard unter Placebo-Therapie generiert. Dazu wurde die reendothelialisierte Carotis-Fläche 3 Tage nach Induktion des Carotisschadens mit der unmittelbar nach erfolgtem Carotid-injury bestimmten, deendothelialisierten Fläche in Relation gesetzt (vgl. 4.3.4.2.). Hier konnte nachgewiesen werden, dass in unbehandelten Tieren nach 3 Tagen durchschnittlich eine Defektheilung von 11,3% erfolgt ($p < 0,01$) (vgl. Abbildung 27).

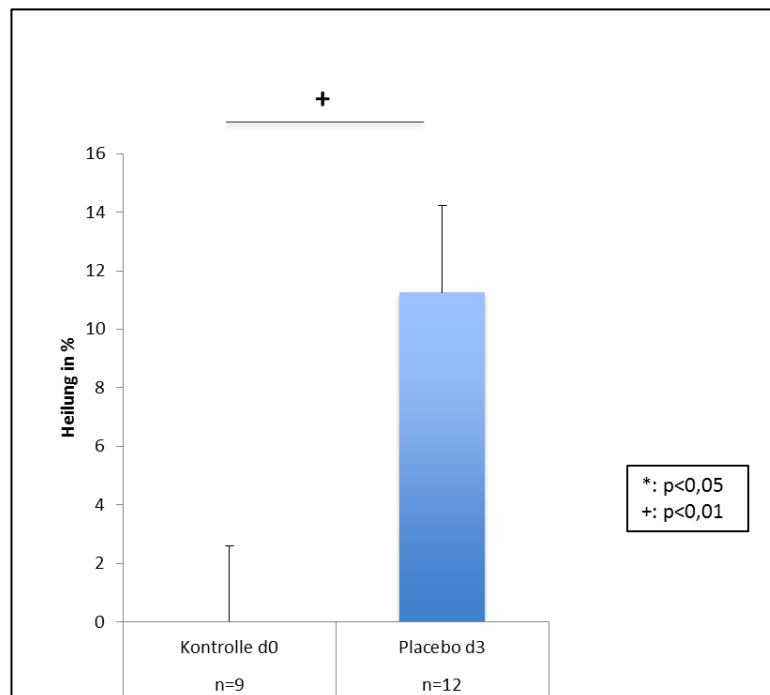


Abbildung 27: Reendothelialisierte Gefäßfläche bei Placebo- behandelten Tieren an Tag 3 verglichen mit Kontrolltieren an Tag 0.

5.4.2. Einfluss von G-CSF und Sitagliptin auf die Reendothelialisierung eines Gefäßschadens

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit Therapieansätze, die bekanntermaßen eine unterstützende Wirkung auf die SDF-1 α /CXCR4-Achse haben, die Reendothelialisierung eines Endotheldefekts positiv beeinflussen können.

Hierfür erhielt eine Versuchsgruppe nach Induktion des Carotisschadens G-CSF zur gesteigerten Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark, um demnach auch die Anzahl CXCR4⁺ endothelialer Progenitorzellen in der Blutbahn zu begünstigen (vgl. 2.6.4.2.). Einer weiteren Gruppe wurde der DPP IV-Inhibitor Sitagliptin verabreicht, wodurch der enzymatische Abbau des SDF-1 α unterbunden wurde (vgl. 2.7.) und eine letzte Gruppe wurde mit einer Kombinationstherapie aus beiden Medikamenten behandelt. Den Therapiegruppen wurden Placebo-behandelte Kontrolltiere gegenüber gestellt.

3 Tage nach Zufügen des Carotisschadens konnte im Anschluss an die Evans Blue-Färbung die reendothelialisierte Fläche der verletzten A. carotis communis unter dem Mikroskop bei Lupenvergrößerung vermessen werden.

Es zeigte sich ein signifikant positiver Effekt auf die Reendothelialisierung bei allen Therapiegruppen verglichen mit der Placebogruppe 3 Tage post injury. Entsprechend wies die G-CSF-Gruppe eine Verbesserung um 8,07 % auf, die Sitagliptin-Gruppe um 10,4 % und die Kombinationstherapiegruppe (G-CSF+ Sitagliptin) sogar um 17,01 %.

Verglich man die einzelnen Therapiegruppen untereinander, war ein signifikanter Benefit der Kombinationstherapie aus G-CSF+Sitagliptin gegenüber der jeweiligen Monotherapie zu verzeichnen. Folglich verbesserte sich das Ergebnis bezugnehmend auf die G-CSF- Monotherapie um 8,9 % und auf die Sitagliptin-Monotherapie um 6,58%. Eine Tendenz, allerdings nicht signifikant, war zwischen den beiden Monotherapien festzustellen. So hatte die Sitagliptin-Therapie gegenüber der G-CSF-Therapie einen Vorteil bei der Defektdeckung von 2,37 % (vgl. Abbildung 28+29).

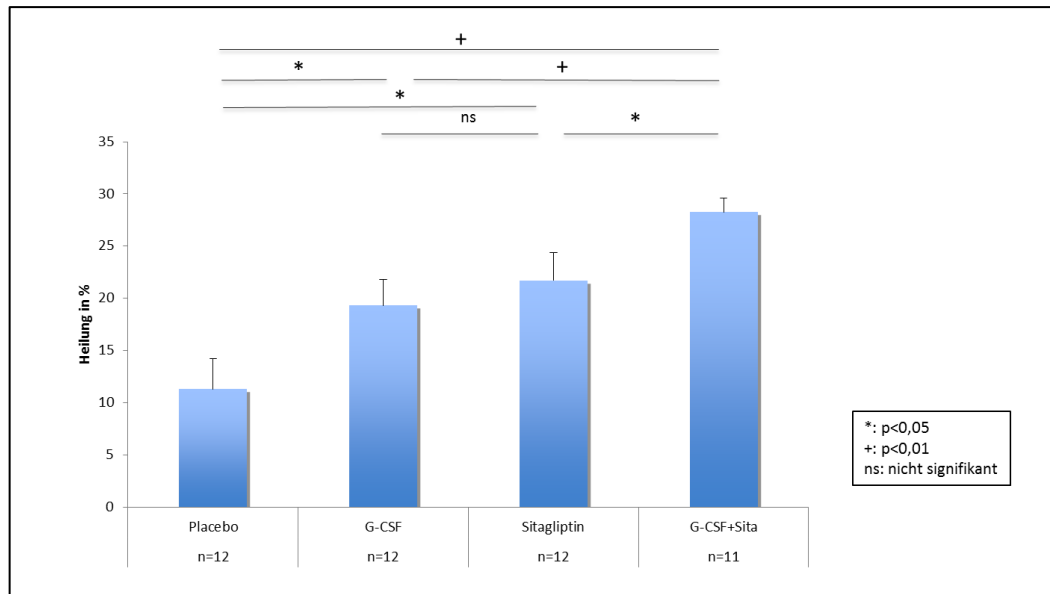


Abbildung 28: Die reendothelialisierte Fläche des Carotisschadens von Saline (Placebo) behandelten Tieren verglichen mit Tieren unter Mono- und Kombinationstherapie (G-CSF und Sitagliptin) an Tag 3, angegeben in Prozent.

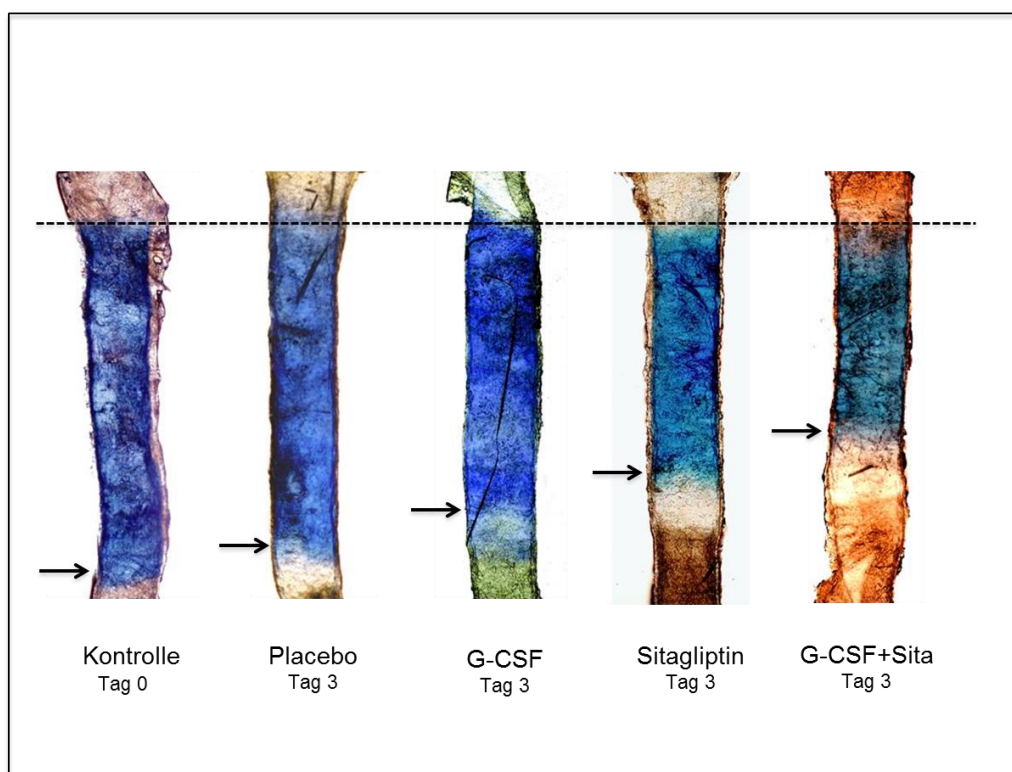


Abbildung 29: Vergleich der Carotiden der einzelnen Versuchsgruppen nach Evans-Blue Färbung (Fotografie in Lupenvergrößerung).

5.4.3. Einfluss von Vildagliptin auf die Reendothelialisierung eines Gefäßschadens

Nach der erwiesenen positiven Wirkung des Sitagliptins auf eine beschleunigte Reendothelialisierung sollte im Anschluss geklärt werden, ob sich dieses Resultat bei Verabreichen eines anderen Gliptins erneut erzielen und folglich ein Klasseneffekt der Gliptine zeigen lässt.

Hierfür wurde wiederum ein Reendothelialisierungs-Assay 3 Tage post injury angefertigt, allerdings wurde bei den betreffenden Versuchsgruppen Sitagliptin durch Vildagliptin ersetzt.

Im Folgenden wurde auch hier eine signifikant beschleunigte Reendothelialisierung in den einzelnen Therapiegruppen gegenüber der Placebo-behandelten Gruppe beobachtet. Die Vildagliptin-therapierten Tiere wiesen dementsprechend eine verbesserte Defektheilung um 12,6 %, die Tiere unter Kombinationstherapie (G-CSF+ Vildagliptin) sogar um 16,93 % auf verglichen mit der Kontrollgruppe.

Es ließ sich ebenso ein signifikanter Vorteil der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie mit G-CSF nachweisen (verbesserte Defektdeckung um 8,86 %), ebenso zeigte die Kombinationstherapie gegenüber der Vildagliptintherapie eine positive Tendenz um 4,32 % (Ergebnis nicht signifikant) (s. Abbildung 30 und 31).

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist ein Klasseneffekt der Gliptine bezüglich der Reendothelialisierung eines Gefäßschadens anzunehmen.

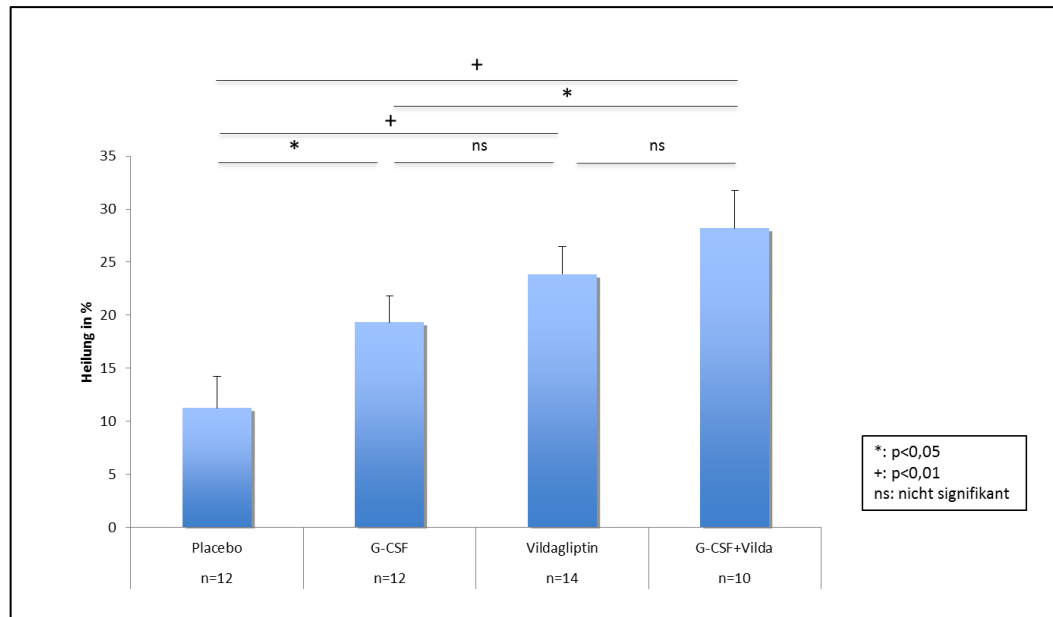


Abbildung 30: Die reendothelialisierte Fläche des Carotisschadens von Saline behandelten Tieren verglichen mit Tieren unter Mono- und Kombinationstherapie (G-CSF und Vildagliptin) an Tag 3, angegeben in Prozent.

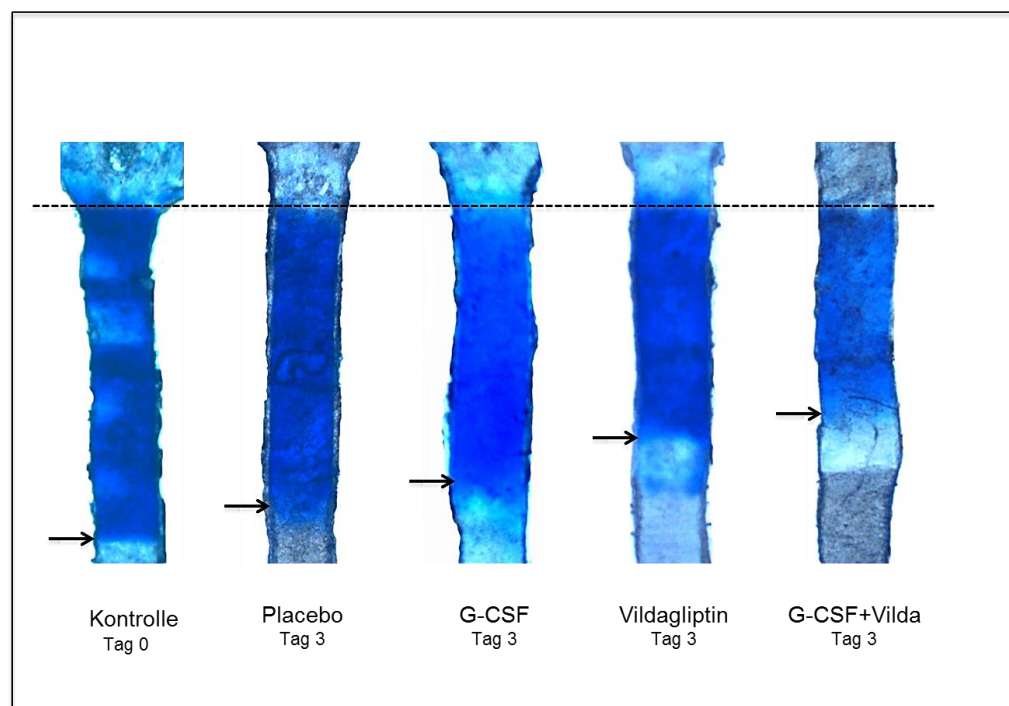


Abbildung 31: Vergleich der Carotiden der einzelnen Versuchsgruppen nach Evans-Blue Färbung (Fotografie in Lupenvergrößerung).

5.4.4. Einfluss der SDF-1 α /CXCR4-Achse auf die Reendothelialisierung eines Gefäßschadens

Anschließend sollte untersucht werden, ob das gesteigerte Homing der Stammzellen und die damit verbundenen positiven Effekte auf die Reendothelialisierung sich tatsächlich auf den von uns postulierten SDF-1 α /CXCR4-Signalweg zurückführen lassen oder ob andere Mechanismen zu Grunde liegen.

Hierfür erhielt eine weitere Gruppe nach Induktion des Carotisschadens zusätzlich zur Sitagliptin-Therapie den hochspezifischen CXCR4-Antagonisten AMD 3100. Die Dosierung wurde mit 1,25 mg/kg entsprechend niedrig gewählt, sodass eine Inhibition der SDF-1 α /CXCR4-Achse am Zielgewebe erfolgte, zugleich aber stammzellmobilisierende Effekte noch nicht auftraten [29] (s. 4.3.1.4).

Auf diese Weise wurde der von uns angenommene Signalweg spezifisch inhibiert um mögliche SDF-1 α /CXCR4-unabhängige Mechanismen zu demaskieren. Nach AMD 3100-vermittelter Blockade des CXCR4-Rezeptors und dadurch erfolgter Inhibition des EPC-Homings ließ sich der oben beschriebene regenerative Effekt der DPP IV-Inhibitoren nicht mehr nachweisen, was die Relevanz des SDF1/CXCR4-Signalwegs bei der Gliptin-vermittelten Endothelregeneration beweist.

Die Reendothelialisierung wurde analog zu den anderen Gruppen 3 Tage nach Carotisschaden mittels Evans-Blue Färbung bestimmt.

Die Versuchstiere, die Sitagliptin in Kombination mit AMD 3100 verabreicht bekamen, zeigten gegenüber der Sitagliptin-Gruppe einen signifikanten Rückgang der Reendothelialisierung um 8,43 %. Folglich lag das Ausmaß der Defektheilung bei 13,27 % fast auf dem Niveau der Placebogruppe (11,26 %) (vgl. Abbildung 32 und 33).

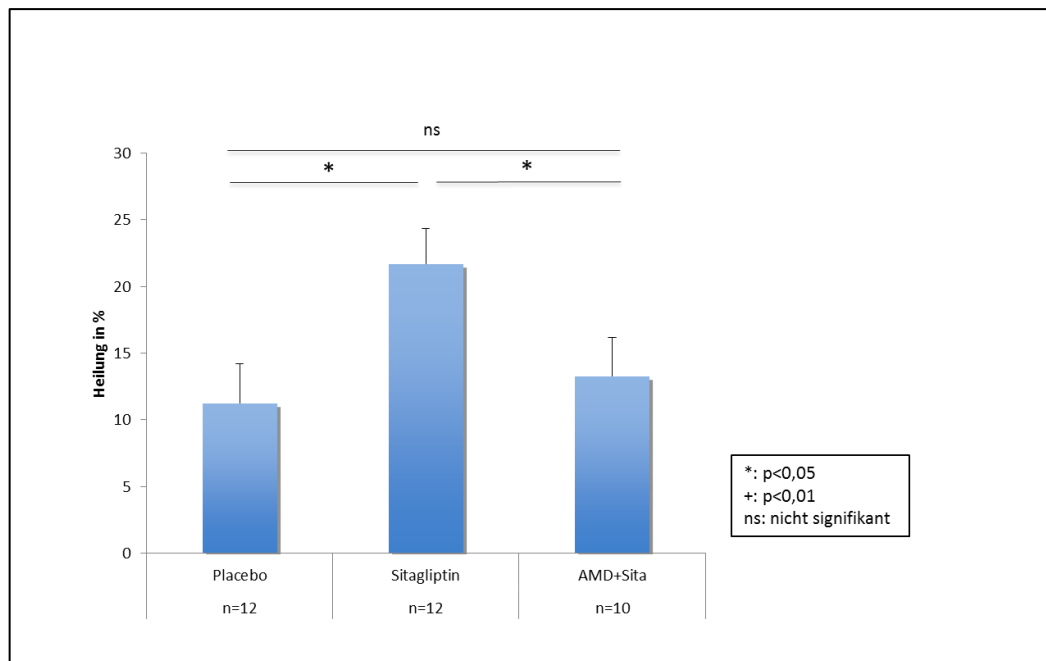


Abbildung 32: Die reendothelialisierte Fläche des Carotisschadens an Tag 3 von Saline behandelten Tieren verglichen mit Tieren unter Sitagliptin-Therapie sowie Tiere, die zusätzlich mit AMD 3100 einen spezifischen CXCR4-Antagonisten erhielten; Angaben in Prozent

Nachfolgend wurde derselbe Versuchsaufbau noch einmal mit Vildagliptin wiederholt. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verringerung der reendothelialisierten Fläche um 11,42 % bei den AMD 3100-behandelten Tieren verglichen mit der Vildagliptin-behandelten Gruppe. Dementsprechend zeigte sich in der mit Vildagliptin- und AMD 3100 kombiniert behandelten Gruppe (Reendothelialisierung von 12,45 %) ein signifikanter Unterschied im Heilungsverhalten im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe (Reendothelialisierung von 11,26 %).

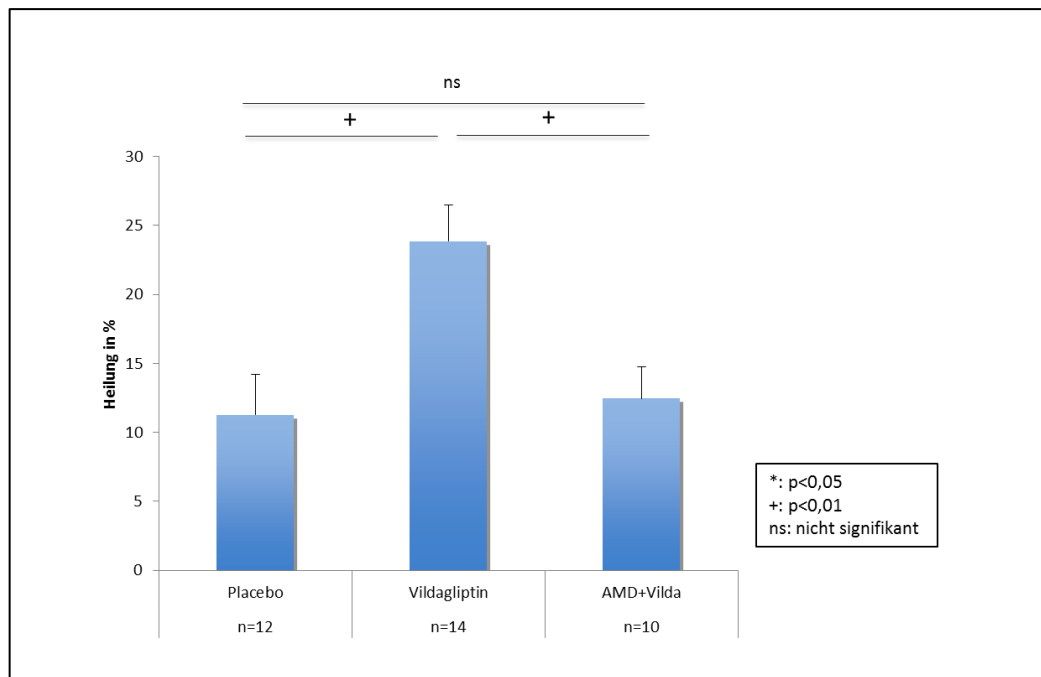


Abbildung 33: Die reendothelialisierte Fläche des Carotisschadens an Tag 3 von Saline behandelten Tieren verglichen mit Tieren unter Vildagliptin-Therapie sowie Tieren, die zusätzlich mit AMD 3100 einen spezifischen CXCR4 Antagonisten erhielten; Angaben in Prozent.

Zusammenfassend konnte mit diesem Versuch die bedeutende Rolle einer intakten SDF-1 α /CXCR4-Achse für das Homing endothelialer Progenitorzellen an einem Endotheldefekt gezeigt werden.

Gruppe	Heilung in %	p-Wert (bezogen auf Placebo)
Placebo	11,26	-
AMD 3100 + Sitagliptin	13,27	0,62
AMD 3100 + Vildagliptin	12,45	0,75
G-CSF	19,33	0,03
Sitagliptin	21,69	0,03
Vildagliptin	23,86	0,001
G-CSF + Sitagliptin	28,27	0,0001
G-CSF + Vildagliptin	28,19	0,001

Tabelle 3: Übersicht aller Versuchsgruppen an Tag 3 bezüglich der Reendothelialisierungswerte (Angaben in %) und p-Werte verglichen mit Placebo.

VI. DISKUSSION

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es zu evaluieren, ob die für die zielgerichtete Migration von zirkulierenden epithelialen Progenitorzellen entscheidende SDF-1 α /CXCR4-Achse durch medikamentöse Intervention mittels DPP IV-Inhibitoren stabilisiert und dadurch verstärkt werden kann. Durch diesen Eingriff sollte entsprechend unserer Hypothese ein verstärktes Einwandern von zirkulierenden Knochenmarks-Vorläuferzellen in die geschädigte Gefäßwand und eine dadurch bedingte verbesserte Heilung und Reendothelialisierung erzielt werden.

Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Es zeigte sich eine Induktion der SDF-1 α -Expression durch die elektrische Endothelschädigung. Diese konnte auf mRNA-Ebene in der deendothelialisierten Carotis verglichen mit der kontralateralen, unverletzten Carotis nachgewiesen werden.

Die orale Gabe von Therapeutika aus der Stoffklasse der Gliptine führte über die Hemmung der proteolytischen Aktivität der DPP IV zu einer Stabilisation des im Serum und im Carotisgewebe verfügbaren SDF-1 α .

Das Verabreichen eines DPP IV-Inhibitors führt zu einem gesteigerten Homing von aus dem Knochenmark stammenden CXCR4⁺ Stammzellen in die geschädigte Gefäßwand.

Durch das Verabreichen von Gliptinen alleine sowie in Kombinationstherapie mit dem Stammzellmobilisator G-CSF ließ sich ein signifikanter Benefit auf die Reendothelialisierung bereits 3 Tage nach Induktion des Endothelschadens erzielen. Hierbei wurde ein Klasseneffekt der Gliptine nachgewiesen.

Eine spezifische Inhibition des SDF-1 α /CXCR4-Signalwegs mittels AMD 3100 hatte zur Folge, dass sich die Defektheilung unter Gliptin-Therapie über 3 Tage nicht verbesserte sondern sich auf dem Niveau der unbehandelten Placebogruppe befand. Rückschließend wurde folglich der bedeutende Einfluss des postulierten Signalwegs auf das Homing endothelialer Progenitorzellen nachgewiesen, die so ihren wesentlichen Teil zur beschleunigten Reendothelialisierung beisteuern.

6.1. BEDEUTUNG DER SDF-1 α /CXCR4-ACHSE AM VERLETZTEN ENDOTHEL

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg des Homingfaktors SDF-1 α in der deendothelialisierten Carotis im Vergleich zu unverletzten Carotiden gezeigt werden (s. Abbildung 21). Dies wurde 48 Stunden nach Induktion eines Carotisschadens auf mRNA-Ebene anhand quantitativer Real-time-RT-PCR ermittelt. Schober *et al.* konnten in SMCs in verletzten Carotiden von *ApoE*^{-/-}-Mäusen ebenfalls einen SDF-1 α -Anstieg nach 24 Stunden mittels Immunhistochemie nachweisen, ebenso im Plasma anhand eines ELISAs [15]. Diesen Zeitpunkt bestätigt auch die Arbeit von Karshovska *et al.* mittels Immunhistochemie [21]. Yin *et al.* wiesen mit einer quantitativen Real-time-RT-PCR nach 24 Stunden eine Zunahme, einen Peak nach 72 Stunden und eine anschließende Abnahme in den Carotiden nach. Ebenso wurde im selben Zeitrahmen eine Abnahme des SDF-1 α Levels im Knochenmark dargestellt, woraus sich auf eine vermehrte Mobilisierung der Stammzellen infolge eines Endothelschadens rückschließen lässt [179].

Es ist mittlerweile anerkannt, dass die SDF-1 α /CXCR4-Achse einen Schlüsselmechanismus im Homing von Stammzellen an einem ischämisch bedingten Gewebeschaden darstellt und an dessen Reparaturvorgängen maßgeblich beteiligt ist [23, 136, 198]. So verursacht der hypoxische Zustand beispielsweise nach akutem Myokardinfarkt die Produktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , der nachfolgend zu einer vermehrten SDF-1 α -Expression innerhalb von 24 Stunden führt [17, 199]. Dass HIF-1 α neben ischämisch auch an traumatisch verursachten Gewebeschädigungen, z. B. mittels sog. wire-injury oder wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt auch mittels elektrischer Deendothelialisierung, die Expression von SDF-1 α induziert, ist eine neuere Erkenntnis. So dienen auch Thrombin, PDGF und Apoptosepartikel nach Endothelschädigung als Stimuli für die Expression von HIF-1 α und konsekutiver SDF-1 α -Produktion [21, 170, 172, 175].

Neben der gesteigerten SDF-1 α -Expression an Endothelschäden ist weiter bekannt, dass dem Knochenmark entstammende endotheliale Progenitorzellen einen entscheidenden Beitrag zu Regenerationsvorgängen am geschädigten Endothel leisten [5, 100, 154, 179, 200]. Der CXCR4-Rezeptor scheint hierbei

einmal mehr von zentraler Bedeutung zu sein [22, 25, 201]. So steigerte ein CXCR4-Gentransfer die Reendothelialisierungskapazität von EPCs signifikant [20]. Hingegen führte die Inhibition des CXCR4-Rezeptors zu einer verminderten Migrationsfähigkeit der EPCs *in vitro* [202] und ebenso zu einem verminderten Homing der EPCs an einen Endotheldefekt *in vivo* [179].

In der vorliegenden Arbeit wurde bei C57BL/6-Mäusen das Homing transplanteder CXCR4⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark am Endothelschaden mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Hierzu wurde einen Tag nach Carotid injury-OP und nachfolgender Transplantation der DiI-gefärbten KM-Zellen das deendothelialisierte Carotisgewebe mit dem unverletzten Gewebe verglichen. An dem verletzten Gefäß wurde ein signifikant höheres Homing von CXCR4⁺-Stammzellen beobachtet (s. Abbildung 22 und 23). Dies steht offensichtlich in direktem Bezug zu der im Vorab nachgewiesenen erhöhten SDF-1 α -Expression, sodass die Beteiligung der SDF-1 α /CXCR4-Achse bei Reendothelialisierungsvorgängen hiermit in unserem Modell bestätigt werden konnte. Die Daten stehen darüber hinaus im Kontext zu jüngsten Ergebnissen von Yin *et al.* So führten in diesen Versuchen sowohl die CXCR4-Inhibition von transplantierten Zellen als auch die SDF-1 α -Ak-Gabe zu einem verminderten Homing der EPCs an einen Endotheldefekt, was sich mittels Immunhistochemie darstellen ließ. Folglich konnte von Yin *et al.* zum ersten Mal eindeutig der positive Einfluss sowohl des Homingfaktors SDF-1 α als auch der CXCR4⁺ Progenitorzellen bei der Regeneration von Endothelschäden nachgewiesen werden [179]; die Einordnung ähnlicher Ergebnisse in diesen Gesamtzusammenhang konnten vorangehende Arbeiten nicht leisten.

6.2. GLIPTINE ALS NEUER THERAPEUTISCHER ANSATZ ZUR STABILISIERUNG DER SDF-1ALPHA/CXCR4-ACHSE BEI ENDOTHELSCHÄDEN

Der Homingfaktor SDF-1 α wird am Zielgewebe hauptsächlich durch die DPP IV inaktiviert [23, 180]. Insofern ist eine Inhibition der DPP IV ein interessanter Therapieansatz, um dadurch einen höheren SDF-1 α -Gradienten am entsprechenden Gewebe für das zielgerichtete Homing der EPCs zu erhalten. Dieses Konzept wurde bereits von Zaruba *et al.* im Myokardinfarktmodell bei der

Maus erfolgreich angewendet, indem das Verabreichen von Diprotin A zu einem positiven Remodeling mit höherer Überlebensrate und verbesserter Pumpfunktion führte [23]. Weiter konnte von Theiss *et al.* gezeigt werden, dass die herausragenden Ergebnisse einer DPP IV-Inhibition am ischämischen Herzen tatsächlich an den SDF-1 α /CXCR4-Signalweg gekoppelt sind [29].

Die vorbeschriebene Relevanz der SDF-1/CXCR4-Achse in der Regeneration von geschädigtem Endothel erlaubte uns eine Übertragung des Therapiekonzepts auf unser Carotid injury-Modell. In der vorliegenden Arbeit wurden als DPP IV-Inhibitoren Gliptine ausgewählt, die bislang klinisch in der Diabetes-Therapie Anwendung finden.

In der massenspektrometrischen Analyse lässt sich das gespaltene, inaktive von dem ungespaltenen, aktiven SDF-1 α unterscheiden. Dementsprechend kann mit dieser Methode eine erfolgreiche DPP IV-Inhibition verifiziert werden. Dazu wurden Mäusen nach Carotid injury-OP 3 Tage mit Sitagliptin bzw. Vildagliptin behandelt und nachfolgend ihr Serum mit rekombinantem SDF-1 α inkubiert. In der Massenspektrometrie zeigten die behandelten Gruppen im Gegensatz zu den unbehandelten Versuchstieren kein Spaltprodukt des SDF-1 α , was beweisend für die stabilisierende Wirkung der Gliptine auf SDF-1 α im Serum zu werten ist (s. Abbildung 24). So lässt sich durch Gliptingabe neben dem Homing von EPCs am Zielgewebe zusätzlich die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark begünstigen, indem der SDF-1 α Gradient im Blut positiv beeinflusst wird [140].

Im Carotisgewebe konnte der inhibierende Effekt von Sitagliptin auf die DPP IV-Aktivität analog zum Serum gezeigt werden (s. Abbildung 26). Darüber hinaus wurde ein weiteres Spaltprodukt sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Sitagliptin-behandelten Gruppe nachgewiesen, dessen Molekulargewicht auf die Aktivität von MMPs im Carotisgewebe rückschließen lässt [203].

Vor allem die MMP-9 ist an der Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark beteiligt, indem sie dort SDF-1 α durch Abspaltung von 4 Aminosäuren am N-terminalen Ende inaktiviert und somit die CXCR4-vermittelte Retention von den Zellen in ihrer Nische destabilisiert [151, 204]. Außerdem ist sie entscheidend bei Ab- und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix aktiv, um so die Motilität und Migration von Zellen zu unterstützen [203, 205, 206]. Folglich überrascht es nicht, dass dieses Enzym auch am geschädigten Endothel

aufgrund der proinflammatorischen Situation in hohem Maße präsent ist [207, 208], schließlich wird es unter anderem von Monozyten exprimiert [39, 209]. Die pro-migratorischen Effekte der MMP-9 auf zirkulierende Progenitorzellen konnte in einem Leberverletzungs-Modell bereits eindrücklich demonstriert werden [205]. Zhang *et al.* fanden erste Hinweise auf eine synergistische Wirkung des CXCR4/SDF-1-Signalwegs und der MMP-9 bei der Rekrutierung von Monozyten an Rückenmarksverletzungen [210]. Nichtsdestotrotz scheint ein Spaltprodukt während Gliptingabe auf den ersten Blick im Widerspruch zu dem postulierten Therapieansatz zu stehen, in dem ein stabilisiertes SDF-1 α im Zielgewebe von großer Bedeutung ist. Möglicherweise lässt sich dieses Spaltprodukt im Sinne eines regulierenden *feedback loops* der MMPs auf das durch Gliptingabe stabilisierte SDF-1 α erklären. Noch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe stützten weiter den postulierten Ansatz, dass Gliptine auf SDF-1 α auch im Carotidgeewebe eine stabilisierende Wirkung ausüben. Dieser Nachweis gelang über ein DPP IV-Enzym-Aktivitäts-Assay (BioVision DPPIV Activity Assay Kit, #K779-100). So wiesen Tiere, die 3 Tage lang nach Induktion des Endothelschadens mit Sitagliptin behandelt wurden, eine signifikante Reduktion der DPP IV-Aktivität im Carotidgeewebe auf verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

In einem weiteren Versuch wurde *in vivo* der Einfluss von Sitagliptin auf die Rekrutierung CXCR4⁺-Stammzellen untersucht. Hierzu wurden die Versuchstiere einen Tag vor Carotid-injury-OP und anschließender Transplantation DiI-gefärbter KM-Stammzellen mit Sitagliptin behandelt, um einen ausreichenden Wirkspiegel sicherzustellen. Nachfolgend wurde das Carotidgeewebe mittels FACS analysiert. Die Sitagliptin-behandelten Tiere zeigten auf der verletzten Seite ein signifikant verbessertes Homing von CXCR4⁺-Zellen verglichen mit der ebenfalls verletzten Carotis von Kontrolltieren (s. Abbildung 22 und 23). Dies weist ein weiteres Mal auf die stabilisierende Wirkung von Gliptinen auf SDF-1 α hin, woraus sich ihr therapeutisches Potenzial hinsichtlich der Rekrutierung von Stammzellen in die geschädigte Gefäßwand schlussfolgern lässt.

6.3. AUSWIRKUNG VON GLIPTINEN UND G-CSF AUF DIE REENDOTHELIALISIERUNG

Die PTA in Kombination mit Stent-Implantation ist mit Abstand die gebräuchlichste Methode der Revaskularisation bei Patienten mit stenosierenden oder okkludierenden Gefäßerkrankungen. Dennoch gilt das Risiko einer Restenose infolge von Neointimabildung nach wie vor als die Schwachstelle dieses Therapieansatzes [87, 211]. Ein entscheidender Faktor in der Entwicklung von Restenosen ist die Endothelschädigung aufgrund des Eingriffs. Die Endothelzellschicht ist wichtig für die Regulation der lokalen Homöostase, Thrombolyse und Proliferation von SMCs [87]. So schirmt eine intakte Endothelzellschicht SMC gegenüber zirkulierenden Wachstumsfaktoren ab, die ihre Proliferation fördern würden. Darüber hinaus produzieren Endothelzellen NO, das der Mitose von SMC entgegenwirkt [86]. Folglich zielen zahlreiche Therapiekonzepte auf die Unterstützung einer raschen Reendothelialisierung ab, was unmittelbar an die Funktion endothelialer Progenitorzellen geknüpft ist [27, 66-68]; in diesen Kontext ist auch die vorliegende Arbeit einzuordnen.

So konnte hier durch G-CSF-Gabe eine signifikant verbesserte Reendothelialisierung nach Carotid injury-OP erzielt werden im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren an Tag 3 (s. Abbildung 28, 29, 30 und 31). Auch bei anderen als in dieser Arbeit verwendeten Endothelschädigungsformen führte die G-CSF-Therapie im Tiermodell zu positiven Ergebnissen im Hinblick auf Reendothelialisierung und Restenoserate. Diese Ergebnisse lassen sich mit der höheren Anzahl an zirkulierenden EPCs aufgrund der Stammzellmobilisierung durch G-CSF erklären [154-156]. Arbeiten von Honold *et al.* wiesen jedoch nach, dass EPCs, die mittels G-CSF mobilisiert wurden, ein vermindertes Homing und Einbußen in ihrer Funktionsfähigkeit aufweisen [212]. Brunner *et al.* kommen im Myokardinfarktmodell bei entsprechend mobilisierten Progenitorzellen zu demselben Ergebnis [213, 214]. Diese Beobachtung lässt sich nach Meinung der Autoren mit einer Destabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse erklären, die durch G-CSF-Administration nicht nur erwünscht im Knochenmark, sondern auch teilweise im Zielgewebe unterbrochen wird. Honold *et al.* konnten beispielsweise eine Spaltung des CXCR4 Epitops 6H8 auf EPCs von entsprechend behandelten Patienten nachweisen. Diese Spaltung wird seiner Ansicht nach durch G-CSF induzierte Proteasen verursacht [212].

Aufgrund der beschriebenen Mängel einer reinen G-CSF-Therapie, galt es den vielversprechenden Ansatz weiter zu optimieren. Zaruba und Theiss *et al.* entwickelten das bedeutende Konzept der dualen Stammzelltherapie am ischämischen Herzen, das einerseits durch G-CSF Mobilisierung den Pool an zirkulierenden Stammzellen vergrößert und andererseits durch DPP IV-Inhibition den Homingfaktor SDF-1 α am Zielgewebe vermehrt bereitstellt, um so für die mobilisierten Zellen ein zielgerichtetes Homing zu erleichtern und mögliche funktionelle Beeinträchtigungen durch die G-CSF-Behandlung zu kompensieren [23, 29].

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Konzept erstmalig auf die Reendothelialisierung übertragen – mit großem Erfolg. So wiesen die Versuchstiere, die eine Kombinationstherapie erhielten, eine signifikant bessere Heilung in der deendothelialisierten Carotis auf als die Kontrollen und die G-CSF-behandelten Gruppen (s. Abbildung 28, 29, 30 und 31). Eine Monotherapie mit Gliptinen brachte gegenüber einer G-CSF Therapie tendenzielle Vorteile, die jedoch statistisch nicht signifikant waren. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass tatsächlich die Kombinationstherapie der Schlüssel zum Erfolg ist. Wie bereits beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Stoffklasse der Gliptine als DPP IV-Inhibitoren untersucht. Zunächst wurden die Versuche mit Sitagliptin durchgeführt und später mit Vildagliptin komplettiert. Durch Nachweis vergleichbarer Ergebnisse in den Vildagliptin-behandelten Versuchsgruppen konnte der Endothel-protective Effekt der Gliptine als Klasseneffekt identifiziert werden. Schlussfolgernd führt die duale Stammzelltherapie zu einer Zunahme im Blut zirkulierender CXCR4⁺ endothelialer Progenitorzellen, wobei insbesondere die gesteigerte Präsenz des Homingfaktors SDF-1 α im Zielgewebe zu ihrer verbesserten Rekrutierung in die geschädigte Gefäßwand führt.

So vermittelt die DPP IV-Inhibition in der vorliegenden Arbeit durch Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse eine schnellere Reendothelialisierung. Dieses Konzept hat folglich großes therapeutisches Potential der Bildung von Restenosen in den geschädigten Gefäßarealen gezielt entgegenwirken zu können, da es die Regeneration einer intakten Endothelzellschicht beschleunigt. Das regenerierte Endothel vermag folglich die durch Gefäßverletzung induzierte Proliferation von SMCs zu unterdrücken.

Als weiterer protektiver Effekt der Gliptin-Therapie wird ferner von anderen

Arbeitsgruppen die Stabilisierung des glucagon-like-peptide 1 (GLP-1) beschrieben. Dieses Inkretin-Hormon hat nachweislich protektive kardiovaskuläre Effekte und wird ebenfalls über die DPP IV inaktiviert [215-220].

Lim *et al.* gelang es jüngst im diabetischen Rattenmodell mit Ballonangioplastie erstmals den therapeutischen Effekt von Sitagliptin auf die Entwicklung von Restenosen zu zeigen. In dieser Arbeit wird der Benefit unter anderem über einen verminderten GLP-1-Abbau erklärt, der einer endothelialen Dysfunktion entgegenwirken soll. Der zugrundeliegende Mechanismus bleibt jedoch noch weitgehend unklar [218]. Manche Arbeiten deuten darauf hin, dass die GLP-1/GLP-1-Rezeptor-Interaktion zu einer Hochregulation von antiapoptotischen Signalwegen führt und so die endotheliale Funktion unterstützt wird [218, 219], zusätzlich wurden auch rezeptorunabhängige Wirkungen beschrieben [221]. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass sich durch die Gabe von Gliptinen die Proliferation von SMCs unterdrücken [189] und die Rekrutierung von Monozyten positiv beeinflussen lässt [51, 189]. Dieses Ergebnis wird über die Inhibition der DPP IV direkt erklärt, die in ihrer aktiven Form über den NF κ B-Signalweg Auswirkungen auf proinflammatorische Gene und Proliferation von SMCs hat [189, 222]. Auch der Rac-Signalweg wird im Zusammenhang mit der DPP IV-abhängigen Zellmigration genannt [51]. In diesem Kontext wirkt Sitagliptin neben der von uns gezeigten beschleunigten Reendothelialisierung im akuten Endothelschaden durch Stabilisation der SDF-1 α /CXCR4-Achse zusätzlich durch Unterdrückung der Proliferation von SMCs und der Migration proinflammatorischer Zellen auf lange Sicht einer Restenose entgegen. Die Stabilisierung des Inkretin-Signalwegs hat offensichtlich additive Effekte, die bei Typ 2-Diabetikern besonders stark ins Gewicht fallen, da sie die Patientengruppe mit dem höchsten Risiko für die Entwicklung insbesondere einer Restenose repräsentieren [223].

Darüber hinaus birgt Sitagliptin gerade durch seine antiinflammatorische und antiproliferative Wirkung ein großes therapeutisches Potential auf dem Gebiet der Prävention chronischer Endothelschädigung, wie sie bei der Pathogenese der Atherosklerose zu beobachten ist. Dieses mögliche Einsatzgebiet ist jüngst Gegenstand zahlreicher präklinischer Studien [51, 224, 225]. Shah *et al.* und Matsubara *et al.* konnten im atherosklerotischen Mausmodell durch die Langzeitgabe von Alogliptin eine signifikante Reduktion der atherosklerotischen

Plaqueareale in der Aorta nachweisen, verbunden mit einer verminderten Monozyten-Adhäsion in den betroffenen Gebieten [51, 224]. Alogliptin hat allerdings bis heute in Deutschland keine Zulassung zur Behandlung von Patienten erhalten – diese bleibt bislang etablierten DPP IV-Inhibitoren wie Sitagliptin oder Vildagliptin vorbehalten. Vittone *et al.* zeigten dazuhin, dass der Gehalt an Kollagen und MMP-9 in den atherosklerotischen Läsionen durch Sitagliptingabe vermindert war, obgleich ihrer Beobachtung nach die Größe der Plaqueareale im Vergleich zu Kontrolltieren durch die Behandlung unbeeinflusst blieb [225]. Auch auf die Endothelfunktion konnte durch die Sitagliptin-Verabreichung positiv Einfluss genommen werden, so wiesen die entsprechenden Tiere ein höheres Vorkommen aktiver eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthasen) auf, die unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation und Koordination der Endothelzellfunktion spielen und denen letzten Endes atheroprotektive Effekte zugeschrieben werden [224, 226]. Den Arbeiten ist gemein, dass sie den durch Gliptingabe hervorgerufenen Benefit auf GLP-1-vermittelte Effekte zurückführen und der cAMP/PKA-Signalweg hierbei von zentraler Bedeutung zu sein scheint. Entsprechend wurde gezeigt, dass GLP-1 *in vitro* die Migration von Monozyten und darüber hinaus die MMP-9-Produktion von Makrophagen hemmt [225]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen in Gegenwart von GLP-1 die Expression proinflammatorischer Zytokine deutlich reduzieren [224]. In welchem Ausmaß bei chronischer Endothelschädigung die Gliptine über eine Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse wirken muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Im akuten Endothelschaden kann der stabilisierte SDF-1 α /CXCR4-Signalweg bereits als der Hauptwirkmechanismus der Gliptine bezüglich einer rascheren Reendothelialisierung verstanden werden. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit nochmals deutlich bestärkt: AMD 3100 ist als wirksamer Stammzellmobilisator bekannt [161, 162]. Allerdings überwiegt unter niedriger Dosierung (1,25 mg/kg) die hochspezifische Hemmung des CXCR4-Rezeptors ohne relevante Stammzell-mobilisierende Effekte [29]. Diese Dosierung wurde von uns genutzt, um die SDF-1 α /CXCR4-Achse am Zielgewebe zu unterbrechen. Durch eine zusätzliche Gliptinbehandlung konnten mögliche Signalwege, die für die Reendothelialisierung von wesentlicher Bedeutung sind und abseits der SDF-1 α /CXCR4-Achse liegen, in Erscheinung treten. Allerdings wurde der protektive

Effekt von Sita- und Vildagliptin auf die Reendothelialisierung durch Gabe von AMD 3100 aufgehoben (s. Abbildung 32 und 33). Die entsprechenden Gruppen lagen 3 Tage nach Induktion des Carotisschadens auf dem Heilungsniveau der unbehandelten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis unterstreicht die hochgradige Relevanz der SDF-1 α /CXCR4-Achse für die Reendothelialisierungsvorgänge an Gefäßen und bestätigt unser vielversprechendes therapeutisches Konzept gleichermaßen.

Der SDF-1/CXCR4-Signalweg wird jedoch in der Literatur nicht nur als rein protektiv, sondern durchaus kontrovers diskutiert. Unter Umständen kann über die Wirkungen von SDF1 α ebenso die Entwicklung einer Restenose gefördert werden. Die Neointima besteht nach heutigem Kenntnisstand zu 60-70% aus SMCs, deren Vorläuferzellen teilweise aus dem Knochenmark rekrutiert werden [21, 227], und nicht wie früher angenommen ausschließlich aus proliferierenden residenten SMCs [228]. Die Mobilisierung und das Homing der SPCs erfolgt über denselben Mechanismus wie das der EPCs, nämlich über die SDF-1 α /CXCR4-Achse. So konnten entsprechende Arbeiten über eine Hemmung dieser Achse eine verminderte intimale Hypertrophie erzielen. Die Behandlung der Versuchstiere mit neutralisierendem SDF-1 α -AK führte zu einer verminderten Neointimabildung [15, 16], ebenso die Knochenmarksrekonstruktion in *ApoE*^{-/-}-Mäusen mit Stammzellen aus embryonalen *Cxcr4*^{-/-}-Mäusen [16].

Dennoch konnte in anderen Versuchen eine Stabilisation dieser Achse der intimalen Hyperplasie erfolgreich entgegenwirken, beispielsweise durch G-CSF-Gabe [154]. Ebenso konnte Lim *et al.* wie bereits näher ausgeführt durch Gliptinverabreichung eine verminderte Neointimabildung beobachten. Obgleich in dieser Arbeit die verminderte Restenose mit der Auswirkung der DPP IV-Inhibition auf den NF κ B-Signalweg begründet wird (Unterdrückung der SMC-Proliferation und Monozyteneinwanderung) [189], hat die Hemmung der DPP IV darüber hinaus eine stabilisierende Wirkung auf SDF-1 α [23, 29]. Dies wurde nicht zuletzt in der vorliegenden Arbeit gezeigt. So lässt sich eine Beteiligung der SDF-1 α /CXCR4-Achse an einer Verminderung der Restenose in diesem Zusammenhang nicht von der Hand weisen. Ebenso sei einmal mehr darauf verwiesen, dass eine rasche Reendothelialisierung von zahlreichen Autoren als der Schlüsselmechanismus in der Vermeidung von Restenosen angesehen wird [27, 28, 86, 187, 188]. Dieser Herausforderung ist unser Konzept der dualen

Stammzelltherapie gerecht geworden, wenn auch vorerst nur im Tiermodell.

Welche Faktoren die Rekrutierung der SPCs bzw. EPCs zum Endotheldefekt hin begünstigen und welcher Mechanismus in einem relevanten Ausmaß zu einer Vermeidung oder Förderung der Restenose führt muss Gegenstand zukünftiger Forschung auf diesem Gebiet sein [190].

6.4. VORTEILE DES ELEKTRISCHEN CAROTID INJURY-MODELLS

Die elektrische Endothelverletzung wurde von Carmeliet *et al.* 1997 erstmals an der *Arteria femoralis* angewandt [229] und nachfolgend von Brouchet *et al.* auf die *Arteria carotis communis* übertragen [230]. Sie steht in Konkurrenz zur Drahtmethode (wire injury), welche die gängigste Methode für die Induktion eines Endothelschadens bei der Maus darstellt. Darüber hinaus ist das Herbeiführen der Endothelverletzung mittels Ballonkatheter (Endothelüberdehnung durch Gefäßdilatation) bei Ratten die Standardmethode [231], da dieses Modell den Endothelschaden, der bei Patienten während der einfachen Ballonangioplastie (PTA) entsteht, nahezu identisch zu simulieren vermag. Allerdings spielt dieses Verfahren bei Mäusen kaum eine Rolle, da aufgrund ihrer geringen Größe der Einsatz solcher Katheter stark limitiert bleibt. Dennoch ist die Maus das am meisten eingesetzte Versuchstier in der gefäßpathologischen Forschung. Dies liegt an der einfachen Verfügbarkeit zahlreich genetisch-veränderter Modelle dieser Spezies. Solche Modelle können angepasst an die jeweilige Fragestellung aufgrund des raschen Generationswechsels der Mäuse, ihres entschlüsselten Genoms und zahlreicher etablierten Techniken innerhalb kürzester Zeit auch neu generiert werden. Die gezielte Genmanipulation der Tiere erlaubt einerseits eine modellhafte Nachstellung von vaskulären Grunderkrankungen des Menschen (*ApoE*^{-/-}-Mäuse, *Ldlr*^{-/-}-Mäuse) und andererseits beispielsweise die Aufschlüsselung relevanter Signalwege durch Ausknocken oder Überexpression spezifischer Gene (*Dpp IV*^{-/-}-Mäuse, *Glp1r*^{-/-}-Mäuse). Darüber hinaus ist die anspruchslose und platzsparende Haltung der Tiere ein weiterer Vorteil (s. 2.5).

Bei der Drahtmethode wird zunächst die *A. carotis externa* aufgesucht und sowohl cranial als auch kaudal am Gefäß eine Ligatur vorgelegt, wobei die craniale Ligatur direkt im Anschluss zugezogen wird. Die Gefäßwand zwischen den

beiden Ligaturen wird inzidiert und anschließend ein gebogener, flexibler Draht eingeführt. Dieser wird bis in die *A. carotis communis* vorgeschoben und mit rotierenden Bewegungen insgesamt dreimal im Innern des Gefäßes auf und ab geschoben, um so die Deendothelialisierung zu induzieren. Anschließend wird der Draht wieder entfernt und die *A. carotis externa* mit dem vorgelegten kaudalen Knoten vollständig abgebunden, dadurch werden Nachblutungen infolge der Inzision verhindert [232]. Ein Nachteil dieser Methode ist das hohe Verblutungsrisiko der Tiere während des Eingriffs. Darüber hinaus ist sie deutlich invasiver als die elektrische Alternative, da die *A. carotis externa* durch das Abbinden irreversibel geschädigt wird. Höhere Versuchstierzahlen sind die Folge.

Ein großes Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die Tierversuche im Sinne der sogenannten 3 R's (*Replacement, Reduction, Refinement*) durchzuführen. Mit Verwendung der elektrischen Carotid injury-Modells wurde ein Carotis-Verletzungsmodell gestärkt, das eine Reduktion der Tierzahlen (*Reduction*) sowie eine weniger belastende Versuchsdurchführung für die eingesetzten Tiere (*Refinement*) erlaubt.

6.5. KOMPLIKATIONEN DES ELEKTRISCHEN CAROTID-INJURY-MODELLS

Bei kleinen Nagern ist im Allgemeinen ein erhöhtes Narkoserisiko zu beachten. Ursache hierfür ist ihr geringes Körpergewicht, wodurch Störungen der Atmung, des Kreislaufs und der Thermoregulation begünstigt werden, gepaart mit einer ungenügenden Möglichkeit des Narkosemonitorings.

Während des Eingriffs im Speziellen muss darauf geachtet werden, dass durch zu intensiven Stromfluss die Gefäßwand nicht verbrannt und dadurch obliteriert wird. Zudem ist bei einem zerstörten Wandaufbau keine physiologische Regeneration mehr zu erwarten. Bei akzidenteller Unterbindung des Blutflusses in der Carotis ohne Möglichkeit einer Rekanalisation wurden die betroffenen Tiere noch intraoperativ euthanasiert. Bei Auftreten einer Gefäßobliteration postoperativ zeigten die Mäuse neurologische Symptome im Sinne einer Halbseitensymptomatik wie Kopfschiefhaltung sowie stereotype Kreisbewegungen. Diese Tiere wurden ebenfalls unmittelbar schmerzlos getötet.

Eine weitere Komplikation bestand während der Präparation der *A. carotis communis*. Durch mechanische Irritation des *N. vagus* konnten hier vagale Kreislaufreaktionen bis hin zum plötzlichen Herztod beobachtet werden. Durch die enge anatomische Lage des *N. vagus* und der *A. carotis communis* musste hier bei der Gefäßpräparation mit besonderer Vorsicht gearbeitet werden.

Selten kam es bei einigen Tieren zur Ruptur der *A. carotis* während des Entfernens von perivaskulärem Bindegewebe und daraus resultierend zu einem hämorrhagischen Schock. Bei postoperativen Todesfällen waren die Ursachen meist nicht klar festzustellen. Insgesamt, sowohl intra- als auch postoperativ, ließ sich eine Ausfallrate von ca. 15 % vermerken.

Intraoperative Komplikationen	Ursache	Postoperative Komplikationen	Ursache
Obliterieren der Carotis	zu intensiver Stromfluss	Auftreten neurologischer Symptome	obliterierte Carotis
vagale Kreislaufreaktionen bis hin zum Herztod	Stimulation des <i>N. vagus</i> während der Präparation	plötzliche Todesfälle	weitestgehend unklar, teilweise auf Narkose zurückzuführen
hämorrhagischer Schock	Ruptur der Carotis während der Präparation		
Narkosezwischenfälle	erhöhtes Narkoserisiko bei kleinen Nagetiere		

Tabelle 4: Überblick über die Komplikationen des Carotid injury-Modells und deren Ursache.

6.6. LIMITATIONEN DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurde im elektrischen Carotid injury-Modell der Maus ein Endotheldefekt induziert, der die entstandenen Schäden durch interventionelle Revaskularisation beim Menschen simulieren soll. Hierfür war der Einsatz von Versuchstieren unverzichtbar, da sich die komplexen Vorgänge wie Mobilisation

und Homing von Stammzellen und gepulster Blutfluss über mehrere Tage *in vitro* nicht realisieren lassen. Dennoch sind auch diesem Modell Grenzen gesetzt, schon was die eingesetzten Versuchstiere betrifft. So wurden die Versuche allesamt an jungen, gesunden und ausschließlich männlichen Mäusen durchgeführt. Patienten, die einer Revaskularisation unterzogen werden, sind jedoch in der Regel älter, weisen chronische hochgradig atherosklerotische Gefäßveränderungen auf und leiden oftmals an Grunderkrankungen, wie Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Hypertonie [30, 44]. Zusätzlich sind EPCs von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen häufig funktionell beeinträchtigt verglichen mit jener gesunder Menschen [130-133, 233]. Dieses komplexe Ausgangsszenario ist im Tierversuch nur bedingt nachzustellen. Da Tiere bis auf wenige Ausnahmen keine Atherosklerose entwickeln [88] ist eine mögliche Herangehensweise die Nutzung genetisch veränderter Tiermodelle, beispielsweise *ApoE^{-/-}*-Mäuse [91, 93]. Trotz genetischer Modifikationen lassen sich aber lediglich an die Pathogenese des Menschen angelehnte Voraussetzungen schaffen, da sich beispielsweise der Lipidstoffwechsel von Mäusen stark von dem des Menschen unterscheidet [88, 97]. Weiter wird mittels Carotid injury-Methode zwar eine Denudation des Gefäßes erreicht, dem Fremdkörper-Stimulus durch die Implantation von Stents kann dieses Modell aber nicht gerecht werden. Dass sowohl die gewählten Versuchstiere, gesunde männliche C57BL/6-Mäuse, als auch das von einer PTA mit Stenting abweichende Carotisverletzungsmodell die Ergebnisse beeinflussen können, ist hierbei nicht auszuschließen. Auch die standardmäßige postoperative Versorgung des Menschen nach erfolgreicher Revaskularisation mit Thrombozytenaggregationshemmern [30, 47] wurde in dieser Arbeit nicht simuliert und kann möglicherweise ebenfalls eine Rolle spielen.

6.7. DUALE STAMMZELLTHERAPIE ZUR BEHANDLUNG VON ENDOTHELSCHÄDEN – EIN AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit konnte mit einer Kombinationstherapie aus Gliptinen und G-CSF eine signifikant schnellere Reendothelialisierung nach Endothelläsion erreicht werden, was allgemein ein Hauptziel bei der Vermeidung von Restenosen darstellt. Darüber hinaus ist die Aufrechterhaltung einer intakten

Endothelzellschicht ein wichtiger Faktor bei der Prävention von Atherosklerose. Diesbezüglich wurde bereits in einer präklinischen Studie das therapeutische Potenzial für Gliptine nachgewiesen [51]. Dennoch besteht nach wie vor ein großer Bedarf die pathogenetischen Mechanismen der Atherosklerose und vor allem der Neointimabildung besser zu verstehen, was auch die Widersprüchlichkeit vieler Veröffentlichungen verdeutlicht. In diesem Zusammenhang konnten wir mit dieser Arbeit einen Beitrag leisten, indem wir die Wichtigkeit einer stabilen SDF-1 α /CXCR4-Achse für das Homing der G-CSF-mobilisierten EPCs im Tiermodell aufzeigen konnten. Eben durch die gezielte Unterstützung dieses Signalwegs mit unserem neuartigen Therapiekonzept gelang es folglich eine schnellere Endotheldefektheilung zu erreichen. Weitere präklinische Studien sind geplant, die sich vor allem auf die Neointimabildung, u. a. auch im Atherosklerosemodell konzentrieren werden.

Sowohl G-CSF als auch Sita- und Vildagliptin sind in Deutschland als Arzneimittel für den Menschen bereits zugelassen und somit hinsichtlich ihrer Unbedenklichkeit für den therapeutischen Einsatz am Menschen grundsätzlich getestet. Die Kombinationstherapie aus G-CSF und Sitagliptin wird momentan erstmalig beim kardiovaskulären Patienten nach akutem Myokardinfarkt in der SITAGRAMI-Studie unserer Arbeitsgruppe untersucht [234], nachdem in den präklinischen Infarkt-Studien ebenfalls positive Effekte nachgewiesen werden konnten.

Die Untersuchung der Endothel-protectiven Wirkung unserer dualen Progenitorzell-Therapie bildet aufgrund der vielversprechenden Daten im hier untersuchten Tiermodell die Grundlage für zukünftige klinische Patienten-Studien.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen infolge von fortgeschrittenen atherosklerotischen Veränderungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. In diesem Zusammenhang ist die transluminale Angioplastie (PTA) bei okkludierenden Gefäßläsionen die am meisten genutzte Therapieoption. Dennoch birgt dieses Verfahrens das Risiko von Restenosen, die aufgrund des verursachten Endotheldefekts und der nachfolgenden neointimalen Hypertrophie entstehen. Eine rasche Reendothelialisierung gilt als Schlüsselfaktor in der Vermeidung von Restenosen. Die SDF-1 α /CXCR4-Achse nimmt entscheidend Einfluss auf die Mobilisation und auf das Homing von zirkulierenden Knochenmarks-Progenitorzellen nach Endothelverletzung. Migrierte EPCs wiederum sind in der Lage eine verbesserte endotheliale Heilung zu vermitteln. Eine Stärkung dieser Achse mittels Gliptinen und G-CSF stellt deshalb einen vielversprechenden Therapieansatz am geschädigten Endothel dar.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die Bedeutung der SDF-1 α /CXCR4-Achse bei der Regeneration eines Endothelschadens durch endotheliale Progenitorzellen zu untersuchen und nachfolgend zu analysieren, inwieweit sich diese Achse bezüglich Reendothelialisierung therapeutisch nutzen lässt.

Es zeigte sich, dass eine Endothelschädigung die Expression des Homing-Faktors SDF-1 α induziert. Durch Verabreichung von Gliptinen konnte der Abbau des SDF-1 α durch Hemmung der proteolytischen Aktivität der DPP IV reduziert werden. Dies führte nachfolgend zu einem gesteigerten Homing von aus dem Knochenmark stammenden CXCR4⁺ Stammzellen in die geschädigte Gefäßwand. Durch das Verabreichen von Gliptinen in Kombination mit dem Stammzellmobilisator G-CSF (duale Progenitorzell-Therapie) ließ sich ein signifikanter Benefit bezüglich einer rascheren Reendothelialisierung erzielen. Aufgrund der Reversibilität dieser Ergebnisse nach AMD 3100-Behandlung, einem spezifischen CXCR4-Antagonisten, ließ sich die verstärkte Einwanderung von Knochenmarksstammzellen in den geschädigten Gefäßabschnitt als zugrundeliegender Mechanismus für die verbesserte Endothelheilung nachweisen.

Die gezeigte Endothel-protective Wirkung der dualen Progenitorzell-Therapie könnte ein vielversprechender Therapieansatz zur Vermeidung von Restenosen

nach PTA sein. Die erhobenen Daten im Tiermodell bilden damit die Grundlage für zukünftige Patienten-Studien.

VIII. SUMMARY

Cardiovascular diseases are the main cause of death in Western industrialized nations. Percutaneous Transluminal Angioplasty (PTA) represents the most commonly used therapeutic option for the treatment of vascular occlusive disease. However, the procedure carries the potential risk of restenosis due to neointima formation after periprocedural endothelial injury. Hence, rapid reendothelialization is regarded as a key factor for the prevention of restenosis. The SDF-1 α /CXCR4 axis has a major impact on mobilization and homing of bone marrow-derived progenitor cells after endothelial injury. These migrated EPCs can then mediate an enhanced reendothelialization. Thus, a stabilization of this crucial homing mechanism by the use of Gliptins and G-CSF may constitute a promising therapeutic approach for the damaged endothelium.

The aim of our project was to investigate the role of the SDF-1 α /CXCR4 axis in EPC-mediated endothelial healing. Furthermore, we planned to analyze the potential therapeutic use of this homing mechanism after vascular injury.

In this work we could show that endothelial damage induces the local expression of the homing factor SDF-1 α . The administration of Gliptins reduced the degradation of SDF-1 α by inhibiting the proteolytic activity of the enzyme DPP IV. This subsequently led to an increased recruitment of CXCR4⁺ bone marrow derived progenitor cells to an electrically induced vascular lesion. By administration of Gliptins in combination with G-CSF (dual progenitor cell therapy) reendothelialization was significantly accelerated. This beneficial effect could be reversed by the administration of AMD 3100, a specific CXCR4 antagonist that was able to block progenitor cell homing. Therefore, we were able to demonstrate that the increased recruitment of bone marrow derived progenitor cells to the damaged vessel wall represents a crucial mechanism for an enhanced vascular repair that can be pharmacologically triggered.

The therapeutic impact of the dual progenitor cell therapy could be a promising approach for the prevention of restenosis following PTA. The data collected in our animal model can be the basis for future clinical trial.

IX. ANHANG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAC	Circulating angiogenic cell
CAS	Coronary artery stenting
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFU	Colony forming unit
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EC	Endothelial cell, reife Endothelzelle
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endothelial progenitor cell, endotheliale Progenitorzelle
FACS	Fluorescent activated cell sorting
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GLP-1	Glucagon-like-peptide 1
GM-CSF	Granulocyte macrophage- colony stimulating factor
h	Stunde
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1	Hypoxia inducible factor 1
HSC	Hematopoietic stem cells, hämatopoetische Stammzellen
IL (-1 β , -3, -5, -8)	Interleukin (-1 β , -3, -5, -8)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
H ₂ O	Wasser
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LPS	Lipopolysaccharide
MMP-9	Matrixmetalloproteinase- 9
MNC	Mononuclear cells, mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger RNA
NO	Stickstoffmonoxid
OEC	Outgrowth endothelial cell
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKC	Proteinkinase C

PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	Subkutan
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SMC	Smooth muscle cell, glatte Muskelzelle
TEA	Thrombendoarteriektomie
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor
VLA-4	Very late antigen 4
vWF	Von-Willebrand-Faktor
VE-Cadherin	Vascular-endothelial-Cadherin
WHHL	Watanabe heritable hyperlipidemic

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. DESTATIS, Internetseite des Statistischen Bundesamts, *Todesfälle 2011 leicht rückläufig-häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen*, 2011.
2. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
3. Gibbons, R.J., et al., *ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: executive summary and recommendations. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients with Chronic Stable Angina)*. Circulation, 1999. **99**(21): p. 2829-48.
4. Sen, S., et al., *Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease*. Clin Sci (Lond), 2011. **120**(7): p. 263-83.
5. Dzau, V.J., et al., *Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases*. Hypertension, 2005. **46**(1): p. 7-18.
6. Griesse, D.P., et al., *Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy*. Circulation, 2003. **108**(21): p. 2710-5.
7. Zhao, X., et al., *Autologous endothelial progenitor cells transplantation promoting endothelial recovery in mice*. Transpl Int, 2007. **20**(8): p. 712-21.
8. Aicher, A., et al., *Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 581-9.
9. Zengin, E., et al., *Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis*. Development, 2006. **133**(8): p. 1543-51.
10. Sengenès, C., et al., *Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells*. Stem Cells, 2007. **25**(9): p. 2269-76.
11. Bussolati, B., et al., *Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 545-55.
12. Ingram, D.A., et al., *Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2783-6.
13. Zentilin, L., et al., *Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3546-54.
14. Aguirre, A., J.A. Planell, and E. Engel, *Dynamics of bone marrow-derived endothelial*

- progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **400**(2): p. 284-91.
15. Schober, A., et al., *Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2003. **108**(20): p. 2491-7.
 16. Zernecke, A., et al., *SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells*. Circ Res, 2005. **96**(7): p. 784-91.
 17. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
 18. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1221-33.
 19. Zampetaki, A., J.P. Kirton, and Q. Xu, *Vascular repair by endothelial progenitor cells*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(3): p. 413-21.
 20. Chen, L., et al., *CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(3): p. 462-70.
 21. Karshovska, E., et al., *Expression of HIF-1alpha in injured arteries controls SDF-1alpha mediated neointima formation in apolipoprotein E deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2540-7.
 22. Zheng, H., et al., *Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(3): p. 274-80.
 23. Zaruba, M.M., et al., *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 313-23.
 24. Christopherson, K.W., 2nd, S. Cooper, and H.E. Broxmeyer, *Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4680-6.
 25. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6996-7007.
 26. Gulati, R., et al., *Autologous culture-modified mononuclear cells confer vascular protection after arterial injury*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1520-6.
 27. Blindt, R., et al., *A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(9): p. 1786-95.
 28. Ong, A.T., et al., *How to accelerate the endothelialization of stents*. Arch Mal Coeur Vaiss, 2005. **98**(2): p. 123-6.

29. Theiss, H.D., et al., *Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis*. Stem Cell Res, 2011. **7**(3): p. 244-55.
30. Herold, G., *Innere Medizin*. 2009.
31. Huppert, P., Adili, F., and R. Bauersachs, *Die S3-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der peripheren und arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK)*. Hessisches Ärzteblatt, 2010: p. 85-102.
32. C. Diehm and H.-J. Trampisch, *Definition und Epidemiologie*. Leitlinien PAVK, 2009: p. 12-14.
33. Gahremanpour, A., E.C. Perin, and G. Silva, *Carotid artery stenting versus endarterectomy: a systematic review*. Tex Heart Inst J, 2012. **39**(4): p. 474-87.
34. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
35. Samson, S., L. Mundkur, and V.V. Kakkar, *Immune response to lipoproteins in atherosclerosis*. Cholesterol, 2012. **2012**: p. 571846.
36. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 508-19.
37. Koenen, R.R. and C. Weber, *Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(12): p. 713-25.
38. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta 3 integrin, and GPIb alpha*. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 329-39.
39. Riccioni, G. and V. Sblendorio, *Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment*. J Geriatr Cardiol, 2012. **9**(3): p. 305-17.
40. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I*. Circulation, 2003. **108**(14): p. 1664-72.
41. BÄK, KBV, AWMF, *Nationale Versorgungsleitlinien Chronische KHK* Köln; Deutscher Ärzteverlag, 2007/2008.
42. Ruß, M., Cremer, J., Krian, A., Meinertz, T., Werdan K. and H.-R. Zerkowski, *Differentialtherapie der chronischen koronaren Herzerkrankung*; Deutsches Ärzteblatt, 2009: p. 253-261.
43. Hachamovitch, R., et al., *Comparison of the short-term survival benefit associated with revascularization compared with medical therapy in patients with no prior coronary artery disease undergoing stress myocardial perfusion single photon emission computed tomography*. Circulation, 2003. **107**(23): p. 2900-7.
44. R. Wayne Elford, M.Y., *The impact of preventive cardiology on coronary artery disease*. CMAJ, 1988. **139**.

45. Schuler, G., et al., *Regular physical exercise and low-fat diet. Effects on progression of coronary artery disease.* Circulation, 1992. **86**(1): p. 1-11.
46. Gaspoz, J.M., et al., *Cost effectiveness of aspirin, clopidogrel, or both for secondary prevention of coronary heart disease.* N Engl J Med, 2002. **346**(23): p. 1800-6.
47. Wienbergen, H., A.K. Gitt, and J. Senges, *[Actual clinical practice of guideline-recommended therapy of acute ST elevation myocardial infarction].* Herz, 2005. **30**(8): p. 700-3.
48. Rodriguez, A.L., et al., *Statins, inflammation and deep vein thrombosis: a systematic review.* J Thromb Thrombolysis, 2012. **33**(4): p. 371-82.
49. Gargiulo, G., et al., *Use of statins in lower extremity artery disease: a review.* BMC Surg, 2012. **12 Suppl 1**: p. S15.
50. Treasure, C.B., et al., *Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease.* N Engl J Med, 1995. **332**(8): p. 481-7.
51. Shah, Z., et al., *Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis.* Circulation, 2011. **124**(21): p. 2338-49.
52. Ärztezeitung, *Stents sind in, Bypässe out.* 2011.
53. Bhargava, B., et al., *New approaches to preventing restenosis.* BMJ, 2003. **327**(7409): p. 274-9.
54. A. Michael Lincoff, E.J.T., *Heart Disease - a textbook of cardiovascular medicine, chapter 39,* 1997.
55. Waller, B.F., *Morphologic observations in coronary arteries, aortocoronary saphenous vein bypass grafts and infant aortae following balloon angioplasty procedures.* Herz, 1985. **10**(5): p. 255-68.
56. Sigwart, U., et al., *Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty.* N Engl J Med, 1987. **316**(12): p. 701-6.
57. Serruys, P.W., et al., *A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group.* N Engl J Med, 1994. **331**(8): p. 489-95.
58. Fischman, D.L., et al., *A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators.* N Engl J Med, 1994. **331**(8): p. 496-501.
59. Macaya, C., et al., *Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: one-year clinical follow-up of Benestent trial. Benestent Study Group.* J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(2): p. 255-61.
60. Betriu, A., et al., *Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon*

- angioplasty in the treatment of de novo coronary artery lesions (START): a four-year follow-up.* J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(5): p. 1498-506.
61. Erbel, R., et al., *Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty.* Restenosis Stent Study Group. N Engl J Med, 1998. **339**(23): p. 1672-8.
 62. Lemos, P.A., P.W. Serruys, and J.E. Sousa, *Drug-eluting stents: cost versus clinical benefit.* Circulation, 2003. **107**(24): p. 3003-7.
 63. Park, S.J., et al., *A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis.* N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1537-45.
 64. Sousa, J.E., P.W. Serruys, and M.A. Costa, *New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part II.* Circulation, 2003. **107**(18): p. 2383-9.
 65. Hill, R.A., et al., *Drug-eluting stents: an early systematic review to inform policy.* Eur Heart J, 2004. **25**(11): p. 902-19.
 66. Lee, J.M., et al., *Comparison of endothelialization and neointimal formation with stents coated with antibodies against CD34 and vascular endothelial-cadherin.* Biomaterials, 2012. **33**(35): p. 8917-27.
 67. Aoki, J., et al., *Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry.* J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(10): p. 1574-9.
 68. Klomp, M., et al., *Design and rationale of the TRI-stent adjudication study (TRIAS) program.* Am Heart J, 2009. **158**(4): p. 527-532 e1.
 69. Lee, Y.P., et al., *Endothelial progenitor cell capture stent implantation in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction: one year follow-up.* EuroIntervention, 2010. **5**(6): p. 698-702.
 70. Serruys, P.W., et al., *A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system (ABSORB): 2-year outcomes and results from multiple imaging methods.* Lancet, 2009. **373**(9667): p. 897-910.
 71. Ormiston, J.A. and P.W. Serruys, *Bioabsorbable coronary stents.* Circ Cardiovasc Interv, 2009. **2**(3): p. 255-60.
 72. Gonzalo, N. and C. Macaya, *Absorbable stent: focus on clinical applications and benefits.* Vasc Health Risk Manag, 2012. **8**: p. 125-32.
 73. Gersh, B., Rutherford, *Chronic coronary artery disease*, in *Heart disease* 1997. p. 1316-1331.
 74. Eagle, K.A., et al., *ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery).* Circulation, 2004. **110**(14): p. e340-437.

75. Aroesty, J., Levin, T. and D. Cutlip . *Bypass surgery versus percutaneous intervention in the management of stable angina pectoris: Recommendations*. www.uptodate.com, 2012.
76. www.herzlinik-muenchen.de.
77. W. Wandschneider, K. Hausegger, J. Weber, G. Noisternig, P. Preiss, P. Hlatky, M. Holzer, *Behandlung der extracraniellen Carotis-Stenose*. Leitlinien zur Schlaganfallprophylaxe des LKH Klagenfurts, 2008.
78. K.-L. Schulte, P.Huppert and J. Tacke, *Interventionelle Therapie der PAVK*. Leitlinien PAVK, 2009.
79. F. Baumann and N. Diehm, *Drug-eluting devices in den Beinschlagadern-update 2012*. Zeitschrift für Gefäßmedizin, 2012.
80. Bonati, L.H., S.T. Engelter, and P.A. Lyrer, *Carotid artery stenting*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13619.
81. H.-C. Diener and M. Grond, *Stent vs. Operation: bei verengter Halsschlagader immer eine Fall-zu-Fall-Entscheidung*. Stellungnahme der DGN zur Intervention bei Carotisstenose, 2010.
82. Groschel, K., et al., *Systematic review of early recurrent stenosis after carotid angioplasty and stenting*. Stroke, 2005. **36**(2): p. 367-73.
83. Greenland, P., et al., *Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events*. JAMA, 2003. **290**(7): p. 891-7.
84. Gruberg, L., et al., *Novel approaches for the prevention of restenosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(11): p. 2555-78.
85. Juliard, J.-M., *Les stents pharmacoactifs*. STV, 2009: p. 373-83.
86. Kipshidze, N., et al., *Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(4): p. 733-9.
87. Douglas, G., et al., *Endothelial cell repopulation after stenting determines in-stent neointima formation: effects of bare-metal vs. drug-eluting stents and genetic endothelial cell modification*. Eur Heart J, 2012.
88. Cullen, P., et al., *Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 535-42.
89. Rapacz, J., et al., *Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis*. Science, 1986. **234**(4783): p. 1573-7.
90. Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda, *Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 141-7.
91. Piedrahita, J.A., et al., *Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene*

- inactivated by gene targeting in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4471-5.
92. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
93. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. Science, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
94. Ishibashi, S., et al., *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 883-93.
95. Watanabe, Y., *Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit)*. Atherosclerosis, 1980. **36**(2): p. 261-8.
96. Buja, L.M., et al., *Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia*. Arteriosclerosis, 1983. **3**(1): p. 87-101.
97. Badimon, L., *Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 356-65.
98. Herrera, V.L., et al., *Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1383-9.
99. Richardson, M., et al., *Vasculopathy and insulin resistance in the JCR:LA-cp rat*. Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 135-46.
100. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. Circ Res, 2004. **95**(4): p. 343-53.
101. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
102. Gehling, U.M., et al., *In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3106-12.
103. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. Blood, 2000. **95**(3): p. 952-8.
104. Sirker, A.A., Z.M. Astroukakis, and J.M. Hill, *Vascular progenitor cells and translational research: the role of endothelial and smooth muscle progenitor cells in endogenous arterial remodelling in the adult*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(4): p. 283-99.
105. Bloom, A.L., J.C. Giddings, and C.J. Wilks, *Factor 8 on the vascular intima: possible importance in haemostasis and thrombosis*. Nat New Biol, 1973. **241**(111): p. 217-9.
106. Stockinger, H., et al., *Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3889-97.

107. Mutin, M., F. Dignat-George, and J. Sampol, *Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules*. Tissue Antigens, 1997. **50**(5): p. 449-58.
108. Broxmeyer, H.E., *Chemokines in hematopoiesis*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(1): p. 49-58.
109. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 593-600.
110. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. E1-7.
111. Gulati, R., et al., *Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1023-5.
112. Hur, J., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 288-93.
113. Lin, Y., et al., *Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 71-7.
114. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-9.
115. Hubel, H.S.G.C.L.C.A., *Endothelial progenitor cells and preeclampsia*. Frontiers in bioscience, 2007.
116. Yoon, C.H., et al., *Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases*. Circulation, 2005. **112**(11): p. 1618-27.
117. Wassmann, S., et al., *Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. e74-83.
118. Werner, N., et al., *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury*. Circ Res, 2003. **93**(2): p. e17-24.
119. Hirschi, K.K., D.A. Ingram, and M.C. Yoder, *Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(9): p. 1584-95.
120. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1185-9.
121. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. N Engl J Med, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
122. Schmidt-Lucke, C., et al., *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair*. Circulation, 2005. **111**(22): p. 2981-7.

123. Eizawa, T., et al., *Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(6): p. 685-6.
124. www.clinicaltrials.gov. 2012.
125. Kalka, C., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3422-7.
126. Kawamoto, A., et al., *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 634-7.
127. Iwasaki, H., et al., *Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction*. Circulation, 2006. **113**(10): p. 1311-25.
128. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3009-17.
129. Tateishi-Yuyama, E., et al., *Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 427-35.
130. Heeschen, C., et al., *Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease*. Circulation, 2004. **109**(13): p. 1615-22.
131. Loomans, C.J., et al., *Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(1): p. 195-9.
132. George, J., et al., *Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation*. Eur Heart J, 2004. **25**(12): p. 1003-8.
133. Scheubel, R.J., et al., *Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(12): p. 2073-80.
134. Nervi, B., D.C. Link, and J.F. DiPersio, *Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization*. J Cell Biochem, 2006. **99**(3): p. 690-705.
135. Simmons, P.J., et al., *The mobilization of primitive hemopoietic progenitors into the peripheral blood*. Stem Cells, 1994. **12 Suppl 1**: p. 187-201; discussion 201-2.
136. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
137. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
138. Jo, D.Y., et al., *Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 101-11.

139. Levesque, J.P., et al., *Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 187-96.
140. Sweeney, E.A., et al., *Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells*. Blood, 2002. **99**(1): p. 44-51.
141. Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, *The biology of hematopoietic stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 35-71.
142. Basu, S., A. Dunn, and A. Ward, *G-CSF: function and modes of action (Review)*. Int J Mol Med, 2002. **10**(1): p. 3-10.
143. Wojakowski, W., et al., *The pro- and anti-inflammatory markers in patients with acute myocardial infarction and chronic stable angina*. Int J Mol Med, 2004. **14**(2): p. 317-22.
144. Leone, A.M., et al., *Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2006. **111**(2): p. 202-8.
145. Kawakami, M., et al., *Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections*. Blood, 1990. **76**(10): p. 1962-4.
146. Lopez, A.F., et al., *Molecular basis of cytokine receptor activation*. IUBMB Life, 2010. **62**(7): p. 509-18.
147. Juttner, C.A., et al., *Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy*. Br J Haematol, 1985. **61**(4): p. 739-45.
148. To, L.B., et al., *Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants*. Bone Marrow Transplant, 1992. **9**(4): p. 277-84.
149. Irandoust, M.I., et al., *Suppressor of cytokine signaling 3 controls lysosomal routing of G-CSF receptor*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1782-93.
150. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 687-94.
151. Jin, F., et al., *Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42**(9): p. 581-8.
152. Semerad, C.L., et al., *G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3020-7.
153. Dlubek, D., D. Drabczak-Skrzypek, and A. Lange, *Low CXCR4 membrane expression on CD34(+) cells characterizes cells mobilized to blood*. Bone Marrow Transplant, 2006.

- 37**(1): p. 19-23.
154. Hasegawa, H., et al., *G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(1): p. 370-6.
155. Yoshioka, T., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(1): p. 61-9.
156. Kong, D., et al., *Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries*. Circulation, 2004. **110**(14): p. 2039-46.
157. Bahlmann, F.H., et al., *Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells*. Blood, 2004. **103**(3): p. 921-6.
158. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. Circulation, 2003. **107**(24): p. 3059-65.
159. Iwakura, A., et al., *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury*. Circulation, 2003. **108**(25): p. 3115-21.
160. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1307-18.
161. Liles, W.C., et al., *Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist*. Blood, 2003. **102**(8): p. 2728-30.
162. De Clercq, E., *The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil)*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(11): p. 1655-64.
163. Dimmeler, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 391-7.
164. Llevadot, J., et al., *HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 399-405.
165. Vasa, M., et al., *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease*. Circulation, 2001. **103**(24): p. 2885-90.
166. Walter, D.H., et al., *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. Circulation, 2002. **105**(25): p. 3017-24.
167. Werner, C., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance*. Diabetes, 2007. **56**(10): p. 2609-15.
168. Schober, A., *Chemokines in vascular dysfunction and remodeling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 1950-9.

169. Stroka, D.M., et al., *HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2445-53.
170. Richard, D.E., E. Berra, and J. Pouyssegur, *Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26765-71.
171. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 535-40.
172. Gorlach, A., et al., *Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 47-54.
173. Page, E.L., et al., *Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48403-9.
174. Albina, J.E., et al., *HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(6): p. C1971-7.
175. Bilton, R.L. and G.W. Booker, *The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation*. Eur J Biochem, 2003. **270**(5): p. 791-8.
176. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
177. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
178. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. Circulation, 2003. **107**(9): p. 1322-8.
179. Yin, Y., et al., *SDF-1alpha involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(4): p. 218-27.
180. Christopherson, K.W., 2nd, et al., *Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26*. Science, 2004. **305**(5686): p. 1000-3.
181. Deacon, C.F., *Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1*. Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2181-9.
182. Lehrke, M. and N. Marx, *Cardiovascular effects of incretin-based therapies*. Rev Diabet Stud, 2011. **8**(3): p. 382-91.
183. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. Lancet, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
184. Gensthaller, B. and K. Gräfe, *Exenatide und Sitagliptin*. Pharmazeutische Zeitung online, 2007.

185. Hirschi, K.K. and M.W. Majesky, *Smooth muscle stem cells*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **276**(1): p. 22-33.
186. Yokoi, H., et al., *Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1{alpha}*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(1): p. 60-7.
187. Rogers, C., et al., *Endogenous cell seeding. Remnant endothelium after stenting enhances vascular repair*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2909-14.
188. Bai, X., et al., *Protein kinase C{delta} deficiency accelerates neointimal lesions of mouse injured artery involving delayed reendothelialization and vasohibin-1 accumulation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2467-74.
189. Lim, S., et al., *Effect of a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, on neointimal formation after balloon injury in rats*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35007.
190. Inoue, T., et al., *Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis*. Circulation, 2007. **115**(5): p. 553-61.
191. Charles River, *Research Models and Services 2013/DEUTSCHLAND*, 2013. p. 26.
192. Briand, F., et al., *Sitagliptin promotes macrophage-to-faeces reverse cholesterol transport through reduced intestinal cholesterol absorption in obese insulin resistant CETP-apoB100 transgenic mice*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(7): p. 662-5.
193. Berg J, T.J., Stryer L, *Biochemie*2003.
194. Chomczynski, P., *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. Biotechniques, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
195. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
196. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
197. Gross, J.H. *Skript zum Kurs "Spektroskopische Methoden in der Anorganischen und Organischen Chemie"*. 1999.
198. Franz, W.M., et al., *Stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 675-6.
199. Askari, A.T. and M.S. Penn, *Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration*. Discov Med, 2003. **3**(18): p. 46-7.
200. Fujiyama, S., et al., *Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells*. Circulation Research, 2003. **93**(10): p. 980-989.
201. Sainz, J. and M. Sata, *CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells*. Arterioscler

- Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 263-5.
202. Walter, D.H., et al., *Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease*. Circ Res, 2005. **97**(11): p. 1142-51.
203. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43503-8.
204. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
205. Kollet, O., et al., *HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 160-9.
206. Vaday, G.G., et al., *Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 885-92.
207. George, S.J., A.B. Zaltsman, and A.C. Newby, *Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein*. Cardiovasc Res, 1997. **33**(2): p. 447-59.
208. Honibald, E.N., et al., *Perioceutics: Matrix metalloproteinase inhibitors as an adjunctive therapy for inflammatory periodontal disease*. J Pharm Bioallied Sci, 2012. **4**(Suppl 2): p. S417-21.
209. Wahl, L.M. and M.L. Corcoran, *Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines*. J Periodontol, 1993. **64**(5 Suppl): p. 467-73.
210. Zhang, H., et al., *Matrix metalloproteinase-9 and stromal cell-derived factor-1 act synergistically to support migration of blood-borne monocytes into the injured spinal cord*. J Neurosci, 2011. **31**(44): p. 15894-903.
211. Rodriguez, A.E., et al., *Late loss of early benefit from drug-eluting stents when compared with bare-metal stents and coronary artery bypass surgery: 3 years follow-up of the ERACI III registry*. Eur Heart J, 2007. **28**(17): p. 2118-25.
212. Honold, J., et al., *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(10): p. 2238-43.
213. Brunner, S., M.G. Engelmann, and W.M. Franz, *Stem cell mobilisation for myocardial repair*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(11): p. 1675-90.
214. Brunner, S., et al., *G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells*. Exp Hematol, 2008. **36**(6): p. 695-702.
215. Read, P.A., et al., *DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease*. Circ Cardiovasc Imaging, 2010. **3**(2): p. 195-201.

216. Bose, A.K., et al., *Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 146-51.
217. Yoon, J.S. and H.W. Lee, *Understanding the cardiovascular effects of incretin*. Diabetes Metab J, 2011. **35**(5): p. 437-43.
218. Grieve, D.J., R.S. Cassidy, and B.D. Green, *Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control?* Br J Pharmacol, 2009. **157**(8): p. 1340-51.
219. Basu, A., et al., *Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(5): p. E1289-95.
220. Green, B.D., et al., *GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP*. Arch Biochem Biophys, 2008. **478**(2): p. 136-42.
221. Ban, K., et al., *Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways*. Circulation, 2008. **117**(18): p. 2340-50.
222. Ohnuma, K., et al., *Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 10117-31.
223. Aronson, D., Z. Bloomgarden, and E.J. Rayfield, *Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(3): p. 528-35.
224. Matsubara, J., et al., *A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(3): p. 265-76.
225. Vittone, F., et al., *Sitagliptin reduces plaque macrophage content and stabilises arteriosclerotic lesions in Apoe (-/-) mice*. Diabetologia, 2012. **55**(8): p. 2267-75.
226. Oemar, B.S., et al., *Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis*. Circulation, 1998. **97**(25): p. 2494-8.
227. Sata, M., et al., *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 403-9.
228. Schwartz, S.M., *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis*. J Clin Invest, 1997. **99**(12): p. 2814-6.
229. Carmeliet, P., et al., *Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 761-76.
230. Brouchet, L., et al., *Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta*. Circulation, 2001. **103**(3): p. 423-8.
231. Reidy, M.A., A.W. Clowes, and S.M. Schwartz, *Endothelial regeneration. V. Inhibition of*

- endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit*. Lab Invest, 1983. **49**(5): p. 569-75.
232. Lindner, V., J. Fingerle, and M.A. Reidy, *Mouse model of arterial injury*. Circ Res, 1993. **73**(5): p. 792-6.
233. Giannotti, G., et al., *Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction*. Hypertension, 2010. **55**(6): p. 1389-97.
234. Theiss, H.D., et al., *Safety and efficacy of SITAgliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis*. Int J Cardiol, 2010. **145**(2): p. 282-4

XI. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. W.-M. Franz, der mir das interessante Thema meiner Doktorarbeit zur Bearbeitung anvertraute und der mich in allen Belangen hervorragend unterstützte und führte.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei Prof. E. Wolf dafür, dass er meine Arbeit an die tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität übernahm.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Christoph Brenner ganz herzlich für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen konstruktiven Gespräche, die unermüdlichen Vorschläge und die ehrliche, menschliche Ebene bedanken- ohne ihn wäre diese Arbeit nicht die, die sie jetzt ist.

Darüber hinaus möchte ich mich für die vorzügliche Kooperation bei Prof. R. Wanke und PD N. Herbach für die Histologie sowie bei PD Lars Israel für die Massenspektrometrie bedanken.

Außerdem danke ich Dr. Christian Rimmbach, Dr. Alexandra Laskowski und Prof. Robert David für den wissenschaftlichen Rat und darüber hinaus für die vielen erheiternden Momente, sowie PD Hans Theiss für sein Engagement.

Ein weiterer besonderer Dank gilt unserer technischen Assistentin Judith Arcifa, für all die Unterstützung, all die Mühe und all das schöne Miteinander.

Ein freundschaftliches Dankeschön gilt den beiden Doktorandinnen Stefanie Ebner und Julia Jung, die mich in besonderem Maß unterstützt und motiviert haben.

Auch möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken, insbesondere bei meinen Mitdoktoranden, ich durfte eine unvergessliche Zeit mit allen verbringen.

Und schließlich danke ich meiner Familie von ganzem Herzen: Meinen Eltern, die mir liebevoll in allen Lebenslagen zur Seite standen und immer an mich geglaubt haben; meinen Schwestern Sinja und Samira für alles was wir gemeinsam gemeistert haben, meiner Cousine Tanja Niederer und meinem Freund Jürgen Ludwig, für sein unglaubliches Verständnis und noch für so Vieles mehr.